



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO**

**Venoma da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* e  
caracterização de um inibidor recombinante de fosfolipase A<sub>2</sub>:  
um possível adjuvante na terapia do envenenamento**

**Gisele Adriano Wiesel**

**Ribeirão Preto**

**2021**

**GISELE ADRIANO WIEZEL**

**Venoma da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* e caracterização de um inibidor recombinante de fosfolipase A<sub>2</sub>: um possível adjuvante na terapia do envenenamento**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane C. A. Braga

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 19/11/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP

Ribeirão Preto

2021

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

Wiesel, Gisele Adriano

Venoma da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* e caracterização de um inibidor recombinante de fosfolipase A<sub>2</sub>: um possível adjuvante na terapia do envenenamento. Ribeirão Preto, 2021. 196 p. : il. ; 30cm.

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

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani.

1. *Crotalus durissus terrificus*. 2. Cascavel. 3. Venoma. 4. Transcriptoma de glândula de peçonha. 5. Proteoma. 6. Inibidor de PLA<sub>2</sub>. 7. PLI. 8. Beta-PLI.

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Gisele Adriano Wiesel

Venoma da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* e caracterização de um inibidor recombinante de fosfolipase A<sub>2</sub>: um possível adjuvante na terapia do envenenamento

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutora em Ciências

Área de Concentração: Toxicologia.

Aprovada em:

### Banca Examinadora

Prof. Dr.: \_\_\_\_\_

Instituição: \_\_\_\_\_ Assinatura: \_\_\_\_\_

*Aos meus pais, Adriano e Júnia, e ao meu  
esposo, Guilherme, por todo amor, carinho  
e compreensão.*

## AGRADECIMENTOS

A Deus, pelo dom da vida e pela proteção e Sua presença em todos os momentos.

Aos meus pais, Adriano e Júnia, e ao meu esposo, Guilherme, por todo amor, compreensão, paciência e incentivo.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológicos (CNPq), à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES, código de financiamento 001) e à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP, processos 2017/00586-6 e 2019/10173-6) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

À Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga, minha orientadora e amiga. Muito obrigada por todos esses anos de ensinamento. Obrigada por ter me aceito no LTA desde quando eu era apenas uma graduanda do 3º ano de Farmácia-Bioquímica, por toda a bagagem de conhecimento passada ao longo desses anos e pelos ótimos momentos de convivência no LTA. Muito obrigada por todo o suporte e incentivo e por “embarcar” neste projeto junto comigo.

A todos os pesquisadores que colaboraram com a construção e análise do venoma da *C. d. terrificus*. Priscila Shibao, Camila Cologna, Romualdo M. Filho, Carlos Ueira-Vieira, Edwin de Pauw e Löic Quinton, muito obrigada por todo o suporte e trabalho dispendido.

Aos professores Dr. Hamilton Cabral, Dra. Elisa Maria de Sousa Russo e Dra. Suzelei de Castro França pelas discussões durante o exame de qualificação (avaliação adicional) que auxiliaram no desenvolvimento deste projeto.

À Profa. Dra. Maria Cristina Nonato pelas discussões sobre expressão de proteínas que proporcionaram uma nova visão durante o desenvolvimento deste trabalho.

Ao biólogo do Biotério Central, Luiz Henrique Pedroza, pela extração de peçonha e manejo do espécime de cascavel (*C. d. terrificus*) para a construção da biblioteca de cDNA.

Ao Prof. Dr. Evanguedes Kalapothakis da Universidade Federal de Minas Gerais por me receber para um estágio em seu laboratório onde pude aprender sobre a construção e análises de sequências de uma biblioteca de cDNA.

À Dra. Karla e à Ma. Iara, funcionárias e amigas do LTA. Muito obrigada por todo suporte técnico, pelo auxílio na execução de alguns experimentos, pelas ricas discussões e ideias que tivemos juntas.

A todos os meus amigos do LTA. Obrigada não apenas pela troca de conhecimentos, mas também pelos anos de convivência, pelas risadas que deixavam os dias mais leves mesmo quando tudo estava difícil e pelos ótimos momentos que passamos juntos. Muito obrigada pela família que formamos, a família LTA.

A Isadora, minha amiga Dora. Muito obrigada pela colaboração neste trabalho, pelos experimentos em conjunto, pelos momentos de desabafo e ajuda e por todos os momentos felizes e histórias que passamos juntas que ficarão guardados na memória.

A todos vocês ficam os meus sinceros agradecimentos. Cada um teve um papel fundamental para que este trabalho pudesse ser realizado. Muito obrigada!

“Viver é enfrentar um problema  
atrás do outro. O modo como você o  
encara é que faz a diferença.”  
(Benjamin Franklin, 1706-1790)

---

## RESUMO

WIEZEL, G. A. **Venoma da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus* e caracterização de um inibidor recombinante de fosfolipase A<sub>2</sub>: um possível adjuvante na terapia do envenenamento.** 2021. 196f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Os acidentes ofídicos no Brasil vêm aumentando ano a ano e são considerados um problema negligenciado de saúde pública. O único tratamento eficaz é a administração do soro antiofídico, mas reações adversas estão relacionadas à sua administração. A crotoxina, um complexo de fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), é um dos componentes mais estudados da peçonha crotálica, mas muitos outros componentes são menos conhecidos devido a sua baixa abundância. Portanto, o presente estudo objetivou a análise do transcriptoma da glândula e do proteoma da peçonha da serpente *Crotalus durissus terrificus*, bem como a caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de PLA<sub>2</sub> (PLI) recombinante dessa serpente. A biblioteca de cDNA da glândula de peçonha foi construída usando a plataforma *Illumina* e o seu proteoma foi investigado através de cromatografia líquida de alta resolução acoplada à espectrometria de massas. A integração de ambos os conjuntos de dados permitiu a análise do venoma, sendo que mais de 30 famílias de componentes foram identificadas no transcriptoma, das quais 15 também foram detectadas no proteoma da peçonha. No entanto, poucas famílias (PLA<sub>2</sub>, SVMP, SVSP e VEGF) são relativamente abundantes e apenas 7 transcritos contribuem com ~82% e ~73% da abundância no transcriptoma e no proteoma, respectivamente. Também foram identificadas sequências de PLIs, que surgem como uma possibilidade de adjuvante na terapia do envenenamento. Esses inibidores são proteínas geralmente encontradas no sangue de serpentes que, recentemente, também têm sido identificadas em glândulas de peçonha. Sendo assim, o gene sintético do inibidor CdtPLI-2 foi expresso em células de *Pichia pastoris* KM71H em meio BMMY com casaminoácidos 1,5%. A seguir, o PLI recombinante rCdtPLI2 foi purificado do meio de cultura através de diferentes etapas cromatográficas e não foi reconhecido pelo soro anticrotálico comercial. O sequenciamento amino-terminal confirmou sua expressão e sua massa molecular foi determinada por MALDI-TOF (41643,599 Da). A digestão do rCdtPLI2 com PNGase F/alfa-manosidase permitiu análise de sua glicosilação e a retirada total do açúcar deixou a proteína insolúvel. O rCdtPLI2 glicosilado não é capaz de inibir PLA<sub>2</sub> ofídicas, mas sua digestão com alfa-manosidase forneceu um inibidor deglicosilado com ação inibitória sobre PLA<sub>2</sub> de diferentes peçonhas ofídicas brasileiras, incluindo PLA<sub>2</sub> ácidas e básicas. As PLA<sub>2</sub> CB-Cdc e Lmr-PLA<sub>2</sub> são significativamente inibidas a partir da proporção de 1:10 (inibidor:toxina). Para a CTx-Cdc, grande inibição é vista a partir da proporção 1:5. Além disso, uma análise preliminar *in vivo* revelou que o rCdtPLI2 deglicosilado pode ser um agente promissor na diminuição do edema causado pela CTx-Cdc. O inibidor (brCdtPLI2) também foi expresso em células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS em meio LB, com indução mantida por IPTG 0,5 mM. Posteriormente, o brCdtPLI2 foi isolado do lisado celular através de diferentes etapas cromatográficas e um ensaio de inibição mostrou que ele inibe a ação enzimática da CB-Cdc, apresentando-se promissor na inibição de outras PLA<sub>2</sub> ofídicas e com a vantagem de ausência de glicosilações. Concluindo, esse trabalho forneceu um banco de dados holístico e abre o caminho para investigações e descobertas de futuros agentes farmacológicos ou alvos na terapia antivenenos.

Palavras-chave: *Crotalus durissus terrificus*. Cascavel. Venoma. Transcriptoma de glândula de peçonha. Proteoma. Inibidor de PLA<sub>2</sub>. PLI. Beta-PLI.

**ABSTRACT**

WIEZEL, G. A. **Venome of the Brazilian rattlesnake *Crotalus durissus terrificus* and characterization of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor: a possible adjuvant in the antivenom therapy.** 2021. 196f. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Snakebite accidents in Brazil have increased yearly and are considered a neglected public health problem. The only effective treatment is the administration of the snake antivenom, but adverse reactions are related to its administration. Crotoxin, a phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) complex, is one of the most studied components in crotalic venom, but many other molecules are less known due to its extremely low abundance. Therefore, this study aimed the analysis of the venom gland transcriptome and the venom proteome of the snake *Crotalus durissus terrificus* as well as the biochemical and functional characterization of a recombinant PLA<sub>2</sub> inhibitor (PLI) from this snake. The venom gland cDNA library was constructed using the Illumina platform and the proteome from this gland was investigated through high resolution liquid chromatography coupled with mass spectrometry. Integration of both datasets allowed the venome analysis, revealing more than 30 protein families in the transcriptome, of which 15 were also detected in the venom proteome. However, few families (PLA<sub>2</sub>, SVMP, SVSP e VEGF) are relatively abundant and only 7 transcripts correspond to, respectively, ~82% and ~73% of the transcriptome and proteome. Sequences of PLIs have also been identified, which appear as possible adjuvant in the antivenom therapy. These inhibitors are proteins usually found in snakes' blood, but they have been detected in venom glands recently. Thus, the CdtPLI-2 synthetic gene was expressed in *Pichia pastoris* KM71H cells in BMMY with 1.5% casaminoacids medium. Next, the recombinant PLI rCdtPLI2 was purified from the culture medium by different chromatographic steps and it was not recognized by the commercial anticrotalic serum. N-terminal sequencing confirmed its expression, and its molecular mass was determined by MALDI-TOF (41643.599 Da). rCdtPLI2 digestion with PNGase F/alpha-mannosidase allowed the analysis of its glycosylation and the protein became insoluble after total sugar removing. The glycosylated rCdtPLI2 cannot inhibit snake venom PLA<sub>2</sub>, but its digestion with alpha-mannosidase provided a deglycosylated inhibitor with and inhibitory action on PLA<sub>2</sub> from different Brazilian snake venoms including acid and basic PLA<sub>2</sub>. The PLA<sub>2</sub> CB-Cdc and Lmr-PLA<sub>2</sub> are significantly inhibited from the ratio 1:10 (inhibitor:toxin). On the other hand, great inhibition is observed from 1:5 ratio for CTx-Cdc. Besides that, an *in vivo* preliminary analysis revealed that the deglycosylated rCdtPLI2 may be a promising agent in reducing edema caused by CTx-Cdc. The inhibitor (brCdtPLI2) was also expressed in *E. coli* BL21(DE3)pLysS cells in LB medium, with expression induction maintained by 0.5 mM IPTG. Subsequently, brCdtPLI2 was isolated from the cell lysate by different chromatographic steps, and an inhibition assay showed it inhibits the CB-Cdc enzyme action, presenting as a promising molecule in the inhibition of other snake venom PLA<sub>2</sub>. Moreover, brCdtPLI2 has advantage that there is no sugar content in its structure. Concluding, this study provided a holistic database and paves the way for investigations and discoveries of future pharmacological agents or targets in antivenom therapies.

**Keywords:** *Crotalus durissus terrificus*. Rattlesnake. Venome. Venom gland transcriptome. Proteome. PLA<sub>2</sub> inhibitor. PLI. Beta-PLI.

---

**LISTA DE FIGURAS**

Figura 1.1 – Principais etapas realizadas para análise do transcriptoma e do proteoma de <i>C. d. terrificus</i> .....	30
Figura 1.2 – O transcriptoma da glândula de peçonha de <i>C. d. terrificus</i> .....	37
Figura 1.3 – Desintegrinas no proteoma da peçonha de <i>C. d. terrificus</i> .....	47
Figura 1.4 – Alinhamento entre as sequências da SVMP P-II C0L2T8 e a desintegrina P21859.....	48
Figura 1.5 – Identificação das desintegrinas na peçonha de <i>C. d. terrificus</i> .....	49
Figura 1.6 – Alinhamento de sequências entre nucleotidases e PDEs.....	56
Figura 1.7 – Domínios estruturais presentes nas PDEs.....	56
Figura 1.8 – Estrutura primária das hialuronidases.....	58
Figura 1.9 – Domínios estruturais dos inibidores de PLA <sub>2</sub> .....	59
Figura 1.10 – Domínios estruturais dos VEGFs.....	60
Figura 1.11 – Domínios estruturais dos inibidores do tipo Kunitz.....	63
Figura 1.12 – Alinhamento de sequência entre as 3FTx Q27J50, A5X2W8 e Cdt3Ftx.....	65
Figura 2.1 – Notificações de acidentes ofídicos A) totais e com gênero não identificado e B) por gênero de serpente entre os anos de 2007 e 2020.....	72
Figura 2.2 – Clivagem de fosfolípídeos de membranas por PLA <sub>2</sub> s de peçonhas de serpentes.....	73
Figura 2.3 – Alinhamento múltiplo para comparação das sequências de aminoácidos dos inibidores CdtPLI-2, CdtPLI-3 e Cdt $\beta$ PLI.....	80
Figura 2.4 – Resumo das principais etapas realizadas na expressão e caracterização das versões recombinantes do CdtPLI-2.....	86
Figura 2.5 – Vetor recombinante pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2.....	88
Figura 2.6 – Vetor recombinante brCdtPLI2_pET-28a(+)......	104
Figura 2.7 – Alinhamento entre as sequências dos $\beta$ -PLIs CdtPLI2 e CdtPLI3.....	108
Figura 2.8 – Transformação da <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ para propagação do plasmídeo recombinante pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2.....	111
Figura 2.9 – Linearização do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 através da digestão com PmeI.....	111
Figura 2.10 – Seleção das colônias transformadas de <i>P. pastoris</i> KM71H.....	112
Figura 2.11 – Confirmação, através de PCR, da presença do gene do rCdtPLI2 nas colônias transformadas de <i>P. pastoris</i> KM71H super-resistentes à zeocina..	114
Figura 2.12 – Avaliação da expressão do rCdtPLI2 pelas colônias crescidas em YPD ágar com zeocina 2000 $\mu$ g/mL.....	115

---

Figura 2.13 – Expressão do rCdtPLI2 pelas colônias 1, 2 e 6 e purificação do sobrenadante por cromatografia de afinidade.....	117
Figura 2.14 – Cromatografia de fase reversa das frações de cromatografia de afinidade contendo o rCdtPLI2 expresso pelas colônias 1, 2 e 6 em escala laboratorial pequena.....	118
Figura 2.15 – Indução da expressão do rCdtPLI2 pela colônia 2 em escala laboratorial.....	119
Figura 2.16 – Purificação do rCdtPLI2.....	120
Figura 2.17 – Reconhecimento do rCdtPLI2 pelo soro anticrotálico comercial.....	121
Figura 2.18 – Predição de epítomos lineares de células B no rCdtPLI2.....	122
Figura 2.19 – Isolamento da CB-Cdc.....	123
Figura 2.20 – Isolamento da CTx-Cdc.....	123
Figura 2.21 – Avaliação da inibição da atividade enzimática das PLA <sub>2</sub> s CTx-Cdc e CB-Cdc sobre o substrato NOB.....	124
Figura 2.22 – Perfil eletroforético para avaliação da N-glicosilação do rCdtPLI2.....	125
Figura 2.23 – Perfil eletroforético do rCdtPLI2 glicosilado e deglicosilado para avaliação de sua O-glicosilação.....	127
Figura 2.24 – Alinhamento entre as sequências do rCdtPLI2 e P-PB.I.....	129
Figura 2.25 – Alinhamento entre as sequências do Cdt <b>s</b> βPLI (GenBank MH479024) e rCdtPLI2.....	130
Figura 2.26 – Determinação da massa molecular do rCdtPLI2 glicosilado.....	130
Figura 2.27 – Perfil eletroforético do rCdtPLI2 glicosilado e deglicosilado em SDS-PAGE 10% para avaliação das reações de deglicosilação com PNGase F e α-manosidase.....	131
Figura 2.28 – Avaliação da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre PLA <sub>2</sub> de serpentes	132
Figura 2.29 – Alinhamento entre as sequências do Cdt <b>s</b> βPLI (GenBank MH479024) e rCdtPLI2 com destaque para as glicosilações.....	134
Figura 2.30 – Atividade inibitória do rCdtPLI2 deglicosilado sobre a atividade fosfolipásica de diferentes peçonhas ofídicas brasileiras.....	135
Figura 2.31 – Perfil eletroforético de diferentes peçonhas ofídicas brasileiras com importância médica.....	136
Figura 2.32 – Densitometria das bandas de proteínas do SDS-PAGE realizado com peçonhas brasileiras de interesse médico.....	137
Figura 2.33 – Isolamento da Lmr-PLA <sub>2</sub> .....	142
Figura 2.34 – Avaliação da inibição de PLA <sub>2</sub> s ácidas e básicas pelo rCdtPLI2 deglicosilado em diferentes proporções.....	143
Figura 2.35 – Alinhamento de sequências das fosfolipases CB-Cdt, CB-Cdc e Lmr-PLA <sub>2</sub>	144

---

---

Figura 2.36 – Alinhamento de sequências de PLA <sub>2</sub> s botrópicas A) Lys49 e B) Asp49 com CB-Cdt e CB-Cdc.....	147
Figura 2.37 – Experimentação animal 1 da avaliação preliminar <i>in vivo</i> da ação antiedematogênica do rCdtPLI2.....	149
Figura 2.38 – Experimentação animal 2 da avaliação preliminar <i>in vivo</i> da inibição do edema causado pela CTx-Cdc.....	151
Figura 2.39 – Eletroforese em gel de agarose do vetor brCdtPLI2_pET-28a(+) após propagação e extração da <i>E. coli</i> DH5α.....	152
Figura 2.40 – Inibição da atividade fosfolipásica pela cultura celular de <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	154
Figura 2.41 – Purificação do brCdtPLI2.....	155
Figura 2.42 – Avaliação da inibição da atividade enzimática da CB-Cdc pelo brCdtPLI2..	156

---

**LISTA DE TABELAS**

Tabela 1.1 – Visão geral do venoma de <i>C. d. terrificus</i> . A abundância está expressa como TPM no transcriptoma da glândula de peçonha e como NSAF no proteoma da peçonha.....	38
Tabela 1.2 – Abundância de cada família de componentes da peçonha no transcriptoma e no proteoma de <i>C. d. terrificus</i> .....	39
Tabela 1.3 – Predição das características de <i>contigs</i> montados a partir do transcriptoma de <i>C. d. terrificus</i> .....	40
Tabela 1.4 – Transcritos relacionados a componentes da peçonha identificados no proteoma.....	44
Tabela 2.1 – PLA <sub>2</sub> e componentes entre 10-20 kDa nas peçonhas botrópicas, crotálicas e laquélica avaliadas na presença do inibidor rCdtPLI2 deglicosilado.....	138

---

**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

3FTx	Toxina três dedos ( <i>three-finger toxin</i> )
5'-NT	5'-nucleotidase
AChE	Acetilcolinesterase
ACN	Acetonitrila
AGC	Controle automático de ganho ( <i>automatic gain control</i> )
ALC	Confiança local média ( <i>average local confidence</i> )
ANOVA	Análise de variância
AOX1	Álcool oxigenase 1
AOX2	Álcool oxigenase 2
APA	Aminopectidase A
APN	Aminopectidase N
BMGY	Meio complexo-glicerol tamponado ( <i>buffered glycerol-complex medium</i> )
BMMY	Meio complexo-metanol tamponado ( <i>buffered methanol-complex medium</i> )
BPP/C-NP	Peptídeo potencializador de bradicinina/peptídeo natriurético do tipo C
CA	Componente ácido da crotoxina
CAI	Índice de adaptação de códons
CB	Componente básico da crotoxina
CB-Cdc	Cadeia básica da crotoxina de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
CB-Cdt	Subunidade básica da crotoxina de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
CBP	Carboxipeptidase
CdcV	Peçonha de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
cDNA	DNA complementar
Cdt	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
CdtV	Peçonha de <i>Crotalus durissus terrificus</i> ( <i>Crotalus durissus terrificus venom</i> )
CEUA	Comitê de Ética no Uso de Animais
CGRP	Proteína rica em cisteína e glicina ( <i>cysteine and glycine rich protein</i> )
CHRP	Proteína rica em cisteína e histidina ( <i>cysteine and histidine rich protein</i> )
CICS	Inibidor de crotoxina do soro de <i>Crotalus</i> ( <i>crotoxin inhibitor from Crotalus serum</i> )

CLEC	Lectina do tipo-C ( <i>C-type lectin</i> )
CLP	Lectina do tipo-C s�milde ( <i>C-type lectin-like protein</i> )
CNF	Fator neutralizador de <i>Crotalus</i> ( <i>Crotalus neutralizing factor</i> )
Cpi	Inibidor de cisteíno-protease
CRIP	Proteína intestinal rica em cisteína ( <i>cysteine rich intestinal protein</i> )
CRISP	Proteína secret�ria rica em cisteína ( <i>cysteine-rich secretory protein</i> )
CTx-Cdc	Crotoxina de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
CV	Volumes de coluna
CYS	Cistatina
CysProt	Ciste�no-protease
DPP	Dipeptidil peptidase
DPP IV	Dipeptidil peptidase IV
DTT	Ditiotreitol
EGF-s�milde	Fator de crescimento epidermal-s�milde ( <i>epidermal-like growth factor</i> )
EI	Inibidor enzimático ( <i>enzyme inhibitor</i> )
ELISA	Ensaio Imunoabsorvente Enzimático ( <i>Enzyme Linked ImmunonoSorbent Assay</i> )
ESI	Ioniza�o por eletrospray ( <i>electrospray ionization</i> )
FDR	Taxa de descoberta falsa ( <i>false discovery rate</i> )
FGF	Fator de crescimento de fibroblasto ( <i>Fibroblast Growth Factor</i> )
Hyal	Hialuronidase
IAA	Iodoacetamida
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IPTG	Isopropil $\beta$ -D-1-tiogalactopiranosida
KAZ	Inibidor de protease do tipo Kazal
KUN	Inibidor de protease do tipo Kunitz
LAAO	L-aminoácido oxidase
LB	Luria Bertani
MALDI-TOF MS	Espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF
MCS	Sítio de clonagem múltipla ( <i>multiple cloning site</i> )
MPBS	PBS-leite

MPi	Inibidor de metaloprotease
MPPE	Metalofosfoesterase ( <i>Metallophosphoesterase</i> )
MS	Espectrometria de massas ( <i>mass spectrometry</i> )
NGF	Fator de crescimento neural ( <i>neural growth factor</i> )
NGS	Sequenciamento de nova geração ( <i>next generation sequencing</i> )
NOB	<i>4-Nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid</i>
NSAF	Fator de abundância espectral normalizado ( <i>normalized spectral abundance factor</i> )
ORF	Quadro de leitura aberto ( <i>open reading frame</i> )
PAS	Ácido periódico de Schiff
pb	Pares de bases
PBS	Salina tamponada com fosfato ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PCR	Reação em cadeia da polimerase ( <i>polymerase chain reaction</i> )
PDE	Fosfodiesterase ( <i>phosphodiesterase</i> )
PDGF	Fator de crescimento derivado de plaquetas ( <i>platelet-derived growth factor</i> )
pI	Ponto isoelétrico
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
PLB	Fosfolipase B
PLD	Fosfolipase D
PLI	Inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub> ( <i>phospholipase inhibitor</i> )
PNGase F	Peptídeo-N-glicosidase F ( <i>peptide-N-glycosidase F</i> )
PTMs	Modificações pós-traducionais ( <i>post-translational modifications</i> )
q.s.p.	Quantidade suficiente para
RNA <sub>m</sub>	RNA mensageiro
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecilsulfato de sódio ( <i>polyacrylamide gel electrophoresis in the presence of sodium dodecyl sulfate</i> )
SVCP	Cisteíno-proteases de peçonha de serpente ( <i>snake venom cysteine proteases</i> )
SVMP	Metaloproteases de peçonha de serpente ( <i>snake venom metalloproteases</i> )
svMPi	Inibidor de metaloproteases de peçonha de serpente ( <i>snake venom metalloprotease inhibitor</i> )
SVSP	Serinoproteases de peçonha de serpente ( <i>snake venom serine proteases</i> )

---

svVEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular de peçonha de serpente ( <i>snake venom vascular endothelium growth factor</i> )
TAE	Tris-acetato-EDTA
TFA	Ácido trifluoroacético
TPM	Transcritos por milhão
VEGF	Fator de crescimento do endotélio vascular ( <i>vascular endothelial growth factor</i> )
VF	Fator de peçonha ( <i>venom fator</i> )
WAP	Waprina-símile
YNB	Base nitrogenada de levedura ( <i>yeast nitrogen base</i> )
YPD	Extrato de levedura peptona dextrose ( <i>yeast extract peptone dextrose</i> )
YPDS	Extrato de levedura peptona dextrose sorbitol ( <i>yeast extract peptone dextrose sorbitol</i> )

## SUMÁRIO

Resumo.....	vii
Abstract.....	viii
Lista de figuras.....	ix
Lista de tabelas.....	xii
Lista de abreviaturas e siglas.....	xiii

### CAPÍTULO I

#### O venoma da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*: uma abordagem integrativa combinando o transcriptoma e o proteoma da sua glândula de peçonha

<b>1.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>21</b>
1.1.1 Bibliotecas de cDNA.....	23
1.1.2 Análise proteômica de peçonhas e venenos.....	25
<b>1.2 OBJETIVOS.....</b>	<b>27</b>
<b>1.3 MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>29</b>
1.3.1 <i>Crotalus durissus terrificus</i> .....	30
1.3.2 Transcriptoma da glândula de peçonha de <i>C. d. terrificus</i> .....	31
1.3.3 Análises <i>in silico</i> dos transcritos da glândula de peçonha.....	32
1.3.4 Proteoma da peçonha de <i>C. d. terrificus</i> .....	32
1.3.4.1 Análise proteômica por espectrometria de massas de alta resolução.....	32
1.3.4.2 Fracionamento da peçonha de Cdt e sequenciamento N-terminal.....	34
<b>1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>35</b>
1.4.1 Análise geral do perfil de expressão da glândula de peçonha e seu proteoma.....	36
1.4.2 Abordagem integrativa da glândula de peçonha.....	49
1.4.3 Componentes particulares à análise transcriptômica.....	62

### CAPÍTULO II

#### Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e funcional da versão recombinante do $\beta$ -PLI CdtPLI2 da glândula de peçonha de *C. d. terrificus*

<b>2.1 INTRODUÇÃO.....</b>	<b>70</b>
2.1.1 Panorama geral dos acidentes ofídicos.....	71
2.1.2 Fosfolipases A <sub>2</sub> e envenenamento.....	72
2.1.3 Tratamento dos acidentes ofídicos.....	75
2.1.4 Inibidores de PLA <sub>2</sub> .....	77
2.1.5 PLIs presentes em glândulas de peçonha.....	79
2.1.6 Expressão heteróloga de proteínas.....	81
2.1.6.1 <i>Escherichia coli</i> .....	81
2.1.6.2 <i>Pichia pastoris</i> .....	82
<b>2.2. OBJETIVOS.....</b>	<b>83</b>

<b>2.3. MATERIAIS E MÉTODOS.....</b>	<b>85</b>
2.3.1 Desenho do gene sintético para expressão heteróloga em <i>Pichia pastoris</i> .....	87
2.3.2 Propagação do plasmídeo pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 em <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	88
2.3.3 Linearização e purificação do vetor recombinante pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2.....	89
2.3.4 Transformação das células KM71H de <i>P. pastoris</i> .....	90
2.3.5 Seleção de colônias multicópias após a transformação.....	91
2.3.6 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 em placa <i>deep-well</i> .....	92
2.3.7 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 pelas colônias nº 1, 2 e 6 em escala laboratorial pequena.....	92
2.3.8. Expressão e purificação do rCdtPLI2 pela colônia nº 2 em escala laboratorial.....	94
2.3.9 Confirmação da expressão do rCdtPLI2.....	95
2.3.10 Reconhecimento do rCdtPLI2 pelo soro anticrotálico comercial.....	95
2.3.11 Predição de epítomos lineares de células B.....	96
2.3.12 Inibição da atividade fosfolipásica pelo rCdtPLI2 glicosilado.....	97
2.3.12.1 Isolamento das toxinas.....	97
2.3.12.2 Atividade enzimática sobre substrato cromogênico.....	97
2.3.13 Avaliação do conteúdo de carboidratos.....	98
2.3.14 Determinação da massa molecular do rCdtPLI2.....	99
2.3.15 Avaliação preliminar da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre PLA <sub>2</sub> de serpentes.....	99
2.3.16 Avaliação da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre diferentes peçonhas ofídicas.....	100
2.3.17 Inibição de fosfolipases ácidas e básicas pelo rCdtPLI2 deglicosilado.....	101
2.3.17.1 Isolamento da Lmr-PLA <sub>2</sub> .....	101
2.3.17.2 Avaliação da atividade inibitória.....	101
2.3.18 Avaliação preliminar <i>in vivo</i> da atividade antiedematogênica do rCdtPLI2.....	102
2.3.19 Desenho do gene sintético para expressão do inibidor recombinante em <i>E. coli</i> .....	103
2.3.20 Propagação do vetor brCdtPLI2_pET-28a(+) em <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	105
2.3.21 Expressão e purificação do brCdtPLI2 em escala laboratorial.....	105
<b>2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>107</b>
2.4.1 Escolha do inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub> .....	108
2.4.2 <i>P. pastoris</i> linhagem KM71H.....	109
2.4.3 Otimização dos códons para desenho do gene sintético.....	109
2.4.4 Propagação do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 em <i>E. coli</i> DH5 $\alpha$ .....	110
2.4.5 Linearização do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 e transformação da linhagem KM71H de <i>P. pastoris</i> .....	111
2.4.6 Seleção de colônias multicópias após transformação.....	113
2.4.7 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 em placa <i>deep-well</i> .....	114
2.4.8 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 pelas colônias 1, 2 e 6 em escala laboratorial pequena.....	115
2.4.9 Expressão do rCdtPLI2 pela colônia nº 2 em escala laboratorial.....	118
2.4.10 Confirmação da expressão do inibidor.....	120
2.4.11 Reconhecimento do rCdtPLI2 pelo soro anticrotálico comercial e predição de epítomos lineares de células B.....	121
2.4.12 Inibição de atividade fosfolipásica pelo rCdtPLI2 glicosilado.....	122
2.4.13 Avaliação do conteúdo de carboidratos.....	125

2.4.14 Determinação da massa molecular do rCdtPLI2.....	130
2.4.15 Avaliação preliminar da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre PLA <sub>2</sub> s de serpentes.....	131
2.4.16 Avaliação da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre diferentes peçonhas ofídicas e suas PLA <sub>2</sub> s.....	135
2.4.17 Avaliação preliminar <i>in vivo</i> da ação antiedematogênica do rCdtPLI2.....	147
2.4.18 Propagação do vetor brCdtPLI2_pET-28a(+) para expressão do CdtPLI2 em <i>E. coli</i> .....	151
2.4.19 Expressão e purificação do brCdtPLI2 em <i>E. coli</i> BL21(DE3)pLysS.....	153
<b>3 CONCLUSÕES.....</b>	<b>157</b>
<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>159</b>
<b>APÊNDICE.....</b>	<b>191</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>194</b>

# CAPÍTULO I

**O venoma da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*: uma abordagem integrativa combinando o transcriptoma e o proteoma da sua glândula de peçonha**

## **1.1 INTRODUÇÃO**

---

As peçonhas de serpentes são misturas de peptídeos e proteínas originadas para auxiliar na paralisação e digestão de presas, afetando diferentes alvos biológicos, como por exemplo, tecido muscular, componentes do sangue, tecido conjuntivo, cascata inflamatória, sistema circulatório, entre outros (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017; BORDON *et al.*, 2020; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004).

As serpentes cascavéis compreendem os gêneros *Crotalus* e *Sistrurus* (UETZ, 2020), mas apenas o primeiro apresenta exemplares na fauna brasileira. Além disso, o gênero *Crotalus* inclui exclusivamente a espécie *Crotalus durissus*, que, no Brasil, tem representantes de 7 subespécies: *C. d. terrificus*, *C. d. collilineatus*, *C. d. cascavella*, *C. d. ruruima*, *C. d. marajoensis*, *C. d. trigonicus* e *C. d. dryinas* (UETZ, 2020), sendo as duas primeiras as subespécies mais prevalentes (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010).

As peçonhas dessas serpentes são muito similares entre si, apresentando ação neurotóxica, atividade de coagulação sobre o fibrinogênio, atividade miotóxica, atividade de agregação de plaquetas e indução de edema (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; DA SILVA-JÚNIOR *et al.*, 2020; SANTORO *et al.*, 1999).

A crotoxina é a toxina de maior proporção em peçonhas crotálicas (FAURE *et al.*, 1994), mas outros componentes já foram descritos, incluindo crotamina, L-aminoácido oxidase (LAAO), hialuronidase, lectina e serino e metaloproteases (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; CALVETE *et al.*, 2012; CALVETE *et al.*, 2010; GEORGIEVA *et al.*, 2010; MELANI *et al.*, 2015).

Embora as peçonhas/venenos animais estejam intrinsicamente relacionadas a ações deletérias no organismo envenenado, seus componentes também podem apresentar potenciais biotecnológicos e serem utilizados, por exemplo, como agentes terapêuticos, cosmeceuticos, adjuvantes e reagentes para ensaios-diagnóstico (BORDON *et al.*, 2020). No entanto, grandes investigações nesse campo só começaram a ser realizadas nas últimas décadas depois do isolamento de alguns peptídeos da peçonha da serpente brasileira *Bothrops jararaca*, que, após vários estudos, serviram como base para o desenvolvimento do Captopril<sup>®</sup>, uma molécula anti-hipertensiva que já foi o medicamento mais utilizado no mundo para o tratamento dessa condição, levando ao faturamento de bilhões de dólares (BORDON *et al.*, 2020; CALVETE, 2009).

Em 2004, a  $\omega$ -conotoxina MVIIA (Ziconitide, Prialt<sup>®</sup>), um peptídeo com 25 resíduos de aminoácidos da peçonha de *Conus magus*, foi aprovada pelo FDA como analgésico para o

tratamento da dor crônica (MILJANICH, 2004). Outros exemplos, entre vários existentes, incluem a clorotoxina isolada da peçonha do escorpião *Leiurus quinquestriatus* para o tratamento de glioma e o exenatida (Byetta<sup>®</sup>), um secretagogo da insulina utilizado no tratamento da diabetes do tipo II aprovado pelo FDA em 2005 (BORDON *et al.*, 2020; VETTER *et al.*, 2011).

Embora as toxinas animais apresentem grande potencial para aplicação terapêutica, existe uma dificuldade em se estudar toxinas minoritárias principalmente devido ao menor rendimento desses componentes em etapas de fracionamento das peçonhas. Portanto, os desafiantes métodos de purificação de proteínas guiados por atividade, em adição ao laborioso trabalho e custo, levam à caracterização daqueles componentes que se apresentam em maior proporção (SHU, 1998). Nesse cenário, as tecnologias ômicas estão desempenhando um papel fundamental ao mudar o foco para toxinas não detectadas anteriormente e desvendando a evolução e composição de peçonhas (BRAHMA *et al.*, 2015; CALVETE, 2012).

### 1.1.1 Bibliotecas de cDNA

A biblioteca de DNA complementar (cDNA) é um conjunto de cópias de DNA que representa sequências de DNA que foram transcritas em moléculas de RNA mensageiros (RNAm), correspondendo, portanto, a genes codificadores de proteínas. Para a construção da biblioteca, os RNAm transcritos em determinada amostra (tecidos, células ou até mesmo de indivíduos inteiros) são extraídos e, para cada um, é feita uma cópia do DNA, chamada de cDNA, catalisada pela enzima transcriptase reversa. A fita simples de DNA é, então, convertida para moléculas de cDNA dupla-fita pela enzima DNA polimerase. No método tradicional, o cDNA é inserido em um vetor de clonagem e cada clone obtido é chamado de clone de cDNA. A coleção inteira obtida é chamada de biblioteca de cDNA (ALBERTS *et al.*, 2010).

O método clássico empregado no sequenciamento do DNA das colônias é o método de Sanger, que faz o uso de uma reação enzimática. Começando com *primers* aleatórios curtos, uma DNA polimerase alonga as fitas complementares. A adição de um dos quatro diferentes dideoxynucleotídeos resulta em uma terminação de cadeia detectável através da emissão de luz de um fluoróforo acoplado à respectiva base por uma câmera, permitindo a identificação do DNA desconhecido (MUTZ *et al.*, 2013; SANGER; NICKLEN; COULSON, 1977).

Após o advento do sequenciamento de cDNA, outras técnicas surgiram para aprimorar a tecnologia de sequenciamento, sendo, então, nomeadas técnicas de sequenciamento de nova geração (do inglês *next-generation sequencing*, NGS). Tais metodologias ainda utilizam a detecção de fluoróforos incorporados às bases nucleotídicas e detecção pela respectiva fluorescência, assim como o método de Sanger. Porém, o NGS permite o sequenciamento diretamente do RNA por meio da incorporação de bases na transcrição após amplificação da molécula-alvo (RNA) pela reação em cadeia da polimerase (*polymerase chain reaction*, PCR) (MCGETTIGAN, 2013; MUTZ *et al.*, 2013).

A utilização das bibliotecas de cDNA em transcriptomas de glândula de peçonha/veneno é uma ferramenta poderosa para desvendar seus componentes e vários compostos com potenciais aplicações biotecnológicas já foram identificados. Como exemplos, podem ser citados a utilização de glândulas de sapos e serpentes. No caso dos anfíbios, destaca-se a identificação de peptídeos com atividades anti-protozoária, anti-cancerígena e anti-HIV nas glândulas de quatro espécies de sapos - *Xenopus laevis*, *Rana pipiens*, *Bombina maxima* e *Lonicera caerulea* (CHEN *et al.*, 2003). Por sua vez, o veneno do sapo brasileiro *Phyllomedusa nordestina* é composto por uma mistura de peptídeos antimicrobianos, moléculas hipotensoras, agonistas de receptores opioides e inibidores enzimáticos (NEIVA *et al.*, 2013).

No caso das serpentes, o estudo do transcriptoma das serpentes *Lachesis muta* e *Crotalus adamanteus* revelaram a presença de importantes famílias de proteínas, como, por exemplo, peptídeos potencializadores de bradicinina, serinoproteases, fatores de crescimento, inibidores de protease do tipo Kunitz, nucleotidases, hialuronidases e proteínas secretórias ricas em cisteína (CRISP) (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2006; ROKYTA *et al.*, 2012). Adicionalmente, o transcriptoma da glândula de peçonha de *Micrurus fulvius* sugere que a diversificação entre as toxinas parece seguir uma especiação que reflete adaptação espécie-específica (MARGRES *et al.*, 2013) e essa descoberta pode abrir novos rumos nos estudos de antivenenos mais específicos.

Existem dezenas de transcriptomas de diferentes glândulas de peçonhas de serpentes disponíveis (BRAHMA *et al.*, 2015). Essa abordagem também já permitiu a identificação de novos componentes na glândula de peçonha de *C. d. collilineatus*, como cardiotoxina, vesprina e inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLI) (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009). Mais recentemente, a análise por NGS, principalmente RNA-seq, tem permitido a identificação de RNAs pouco

expressos de uma maneira mais sensível, rápida e com menor custo (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2016; SCHUSTER, 2008).

A partir dos dados resultantes de transcriptomas obtidos por NGS, pode-se construir *primers* específicos, bem como utilizar ferramentas de engenharia genética para produção de proteínas recombinantes para diversos fins. Além disso, a produção de proteínas heterólogas por sistemas apropriados permite a obtenção da toxina de interesse em grande quantidade, possibilitando diversos estudos e descobertas para futuras aplicações (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017; BORDON *et al.*, 2020; VETTER *et al.*, 2011).

### 1.1.2 Análise proteômica de peçonhas e venenos

Outra abordagem para desvendar misturas complexas secretadas por glândulas de peçonhas é o proteoma/peptidoma desenvolvido devido ao advento das tecnologias de espectrometria de massas (MS) (ESCOUBAS; KING, 2009; ESCOUBAS; QUINTON; NICHOLSON, 2008). A respeito das peçonhas de serpentes, a estratégia “*bottom-up*”, em que peptídeos/proteínas são digeridos anteriormente a uma análise MS, é a mais utilizada e usada para criar bibliotecas virtuais de compostos naturais para aplicações biotecnológicas, melhoramento de antivenenos, previsão de características do envenenamento e, até mesmo, para analisar divergência genética e variação geográfica (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; CALVETE *et al.*, 2012; ESCOUBAS; KING, 2009; SUNAGAR *et al.*, 2016).

Diferentes técnicas de separação têm sido empregadas antes e após a digestão da amostra para melhorar a relação sinal-ruído e a cobertura das proteínas e para reduzir a interferência entre os peptídeos (ABD EL-AZIZ; SOARES; STOCKAND, 2020; LOMONTE; CALVETE, 2017). Entre essas técnicas, destacam-se a eletroforese em gel uni e bidimensional, a cromatografia líquida de proteínas com diferentes resinas e colunas (principalmente colunas de fase reversa) e a eletroforese *OFFGEL*. Após a separação, os peptídeos obtidos podem ser analisados por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF/TOF ou de ionização por *eletrospray* (ESI) (ABD EL-AZIZ; SOARES; STOCKAND, 2020; LOMONTE; CALVETE, 2017).

Além da estratégia “*bottom-up*”, a estratégia “*top-down*”, em que a proteína é analisada de forma intacta por MS, sem uma digestão prévia, tem sido recentemente empregada na análise proteômica de peçonhas, com especial atenção para a identificação de diferentes proteoformas

em uma mesma peçonha (MELANI; NOGUEIRA; DOMONT, 2017; SUNAGAR *et al.*, 2016). Esse tipo de análise foi primeiramente utilizado no caso de peçonhas com maior abundância de peptídeos e pequenas proteínas (ANAND *et al.*, 2014; PETRAS *et al.*, 2015; SUNAGAR *et al.*, 2016; UEBERHEIDE *et al.*, 2009), mas proteínas maiores já têm sido identificadas recentemente através dessa abordagem (GHEZELLOU *et al.*, 2021)

Até o momento, já foram publicados estudos proteômicos de peçonhas de mais de 100 espécies de serpentes, mas, embora 63 famílias de proteínas já tenham sido identificadas, mais da metade dessas famílias está sempre presente em baixa concentração (TASOULIS; ISBISTER, 2017), evidenciando a importância do estudo de toxinas minoritárias. Embora alguns grupos já tenham investigado o proteoma de *C. d. terrificus*, nenhuma análise transcriptômica foi publicada até o momento da realização deste trabalho (CALVETE *et al.*, 2010; GEORGIEVA *et al.*, 2010; MELANI *et al.*, 2015).

Atualmente, o estado da arte da compreensão de peçonhas e venenos depende de tecnologias ômicas e sua integração para se obter uma visão holística de tais amostras. Nesse sentido, o termo “venômica” foi recentemente lapidado e tem sido atribuído ao uso dessas tecnologias para desvendar a composição completa de peçonhas e venenos (SUNAGAR *et al.*, 2016).

Sendo assim, este capítulo apresenta a análise de transcriptoma RNA-seq, o proteoma da peçonha e a integração de ambas as bibliotecas de um espécime de *Crotalus durissus terrificus*. Além disso, abre caminho para a descoberta e o estudo de proteínas não detectadas anteriormente na peçonha de *C. d. terrificus* e provavelmente envolvidas no processo de envenenamento.

## **1.2 OBJETIVOS**

Os objetivos desse capítulo incluíram a construção de uma biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *C. d. terrificus* e a análise proteômica da peçonha produzida por essa glândula, bem como a integração dos dados de ambas as abordagens para uma visão holística da peçonha produzida por essa serpente brasileira. Para isso, foram realizados:

- ✓ Construção da biblioteca de cDNA através do sequenciamento de nova geração
- ✓ Análise *in silico* dos transcritos da glândula de peçonha
- ✓ Análise do proteoma da glândula de peçonha através de espectrometria de massas de alta resolução
- ✓ Fracionamento da peçonha por cromatografia líquida de proteínas e sequenciamento N-terminal das frações de interesse
- ✓ Integração dos dados obtidos em todas as abordagens realizadas

## **1.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

A figura 1.1 resume as principais etapas realizadas para análises do transcriptoma da glândula e do proteoma da peçonha de *C. d. terrificus*.

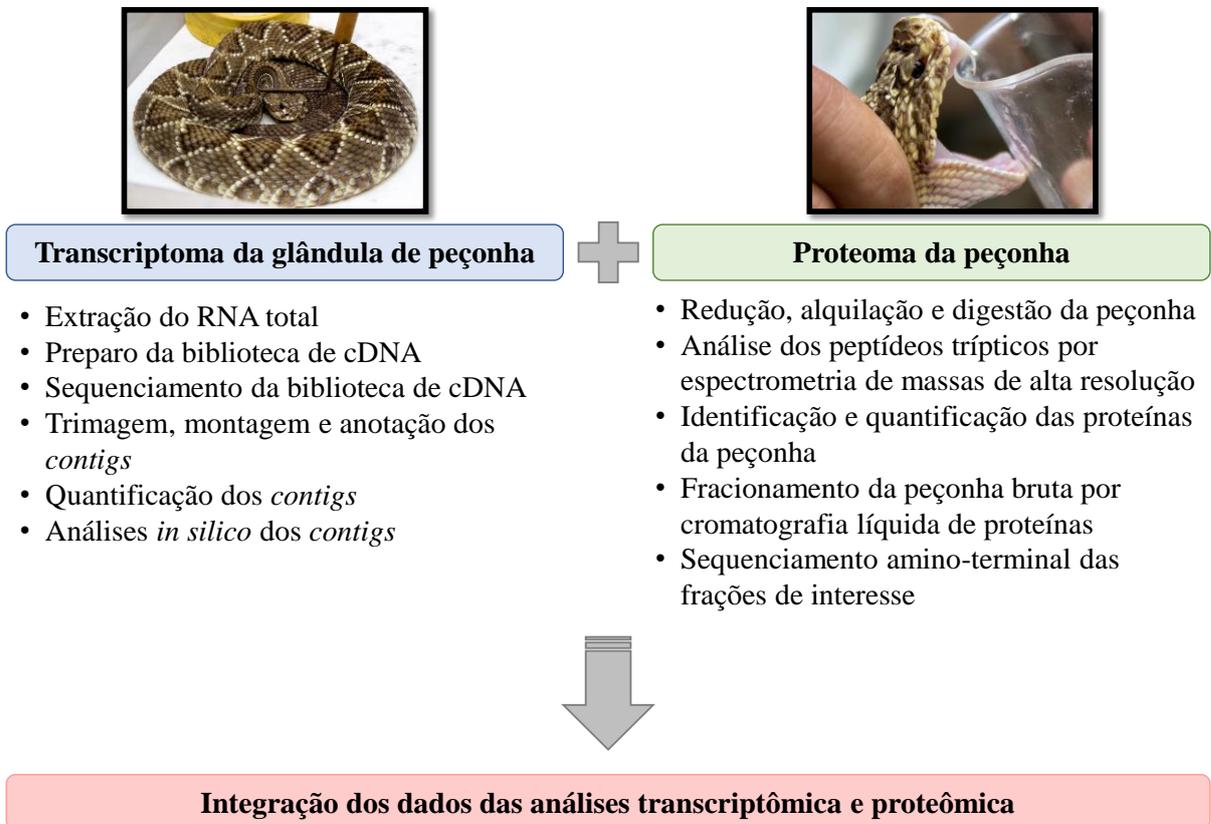


Figura 1.1. Principais etapas realizadas para análise do transcriptoma e do proteoma de *C. d. terrificus*.

### 1.3.1 *Crotalus durissus terrificus*

O espécime (macho) de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) foi capturado na região de Ribeirão Preto (21° 10' 36" S, 47° 49' 15" W) e mantido no Serpentário da Universidade de São Paulo (USP), *campus* Ribeirão Preto, de acordo com as diretrizes do Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA). A glândula de peçonha usada no estudo foi obtida desse mesmo espécime, que produz peçonha de coloração branca. A peçonha de *C. d. terrificus* (CdtV) foi extraída através de compressão da glândula de peçonha três dias antes da extração desta. Em seguida, a peçonha foi dessecada e armazenada a -20 °C até o momento do uso.

Para a extração da glândula de peçonha, o espécime de Cdt foi sacrificado seguindo as diretrizes ARRIVE. Os experimentos foram revisados e aprovados pela Comissão de Ética no Uso de Animais (CEUA) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP)

– USP (processo número 15.5.256.60.2, ANEXO A). Para este propósito, uma dose combinada dos anestésicos cetamina (10 mg/kg) e pentobarbital (150 mg/kg) de acordo com o peso da serpente foi aplicada através de acesso intravenoso para sacrificar o animal. A glândula de peçonha foi imediatamente extraída.

### 1.3.2 Transcriptoma da glândula de peçonha de *C. d. terrificus*

O transcriptoma da glândula de peçonha de *C. d. terrificus* foi realizado em colaboração com o Professor Carlos Ueira Vieira (Instituto de Biotecnologia, Universidade Federal de Uberlândia). Para isso, o RNA total foi extraído da glândula utilizando o reagente TRIzol® (*Life technologies*, EUA) seguindo o protocolo do fabricante e sua integridade e recuperação foram avaliadas pelo *2100 Bioanalyzer* (Agilent, EUA).

A biblioteca de cDNA foi preparada com o kit *TruSeq Stranded mRNA* (Illumina, EUA). *Reads paired-end* (2x100 pb) foram sequenciadas em duplicata na plataforma *Illumina 2500 HiSeq* (Illumina) utilizando os kits *Truseq SBS v3-HS 200 cycles* e *Truseq PE cluster v3 cBot-HS* (Illumina).

*Reads* brutas foram trimadas no Galaxy (BLANKENBERG *et al.*, 2010) – através da ferramenta Trimmomatic (BOLGER; LOHSE; USADEL, 2014) – para remover sequências de adaptadores e descartar *reads* pequenas (<60 pb) e de baixa qualidade (Q<22). A análise de qualidade das *reads* brutas e trimadas foi realizada pelo *software* em java FastQC (ANDREWS, 2010).

As *reads* trimadas de ambas as replicatas foram *de novo* montadas com a ferramenta Trinity (GRABHERR *et al.*, 2011) usando os seguintes parâmetros: *k-mer* = 31, *contig minimum length* = 200, *group pairs distance* = 500 e *path reinforcement* = 75. A ferramenta Transrate (SMITH-UNNA *et al.*, 2016) foi usada para avaliar a qualidade da montagem, incluindo o mapeamento dos *contigs* montados, contra 186.068 sequências do genoma de *Crotalus horridus* (GenBank: LVCR00000000.1) e 4.271 sequências das montagens de transcriptoma *shotgun* de *C. adamanteus* (GenBank: GFHW00000000.1, GDBB00000000.1 e GBEX00000000.1).

Os quadros de leitura abertos (*open reading frames*, ORFs) foram preditos pelo Transdecoder (HAAS *et al.*, 2013). *Splice junctions* foram preditas pelo Tophat (KIM *et al.*, 2013) e os *contigs* resultantes foram anotados contra o banco de dados de proteínas não

redundante (NR) do *National Center for Biotechnology Information* (NCBI) através do *diamond aligner* disponível na plataforma *online* Fastannot (BUCHFINK; XIE; HUSON, 2015).

A abundância dos *contigs* foi expressa como “transcritos por milhão” (TPM) e estimada pelo Salmon (PATRO *et al.*, 2017; WAGNER; KIN; LYNCH, 2012). As *reads* trimadas e os *contigs* montados foram depositados no *European Nucleotide Archive* – ENA (<http://www.ebi.ac.uk/ena>).

### 1.3.3 Análises *in silico* dos transcritos da glândula de peçonha

As análises *in silico* foram realizadas utilizando sequências disponíveis no NCBI, UniProt (UNIPROT CONSORTIUM, 2015) e também as sequências montadas a partir do transcriptoma da glândula de peçonha de Cdt. Alinhamentos de múltiplas sequências foram gerados pelas ferramentas *Clustal Omega* (SIEVERS *et al.*, 2011) ou *MultAlin* (CORPET, 1988) e editados pelo *BioEdit Sequence Alignment Editor* (Ibis Biosciences, USA) e/ou *ESPrpt server* (ROBERT; GOUET, 2014). Análises de domínios foram realizadas pelo *Modular Architecture Research Tool* (SMART) (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015).

### 1.3.4 Proteoma da peçonha de *C. d. terrificus*

#### 1.3.4.1 Análise proteômica por espectrometria de massas de alta resolução

As análises por espectrometria de massas da peçonha de Cdt foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Lóic Quinton (*Mass Spectrometry Laboratory*, Liège Université, Bélgica).

Para isso, a peçonha branca de Cdt (20 µg) foi dissolvida em solução-tampão NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 50 mM e reduzida com ditioneitol (DTT) 10 mM. Após 45 min em 56 °C, a amostra foi alquilada com iodoacetamida (IAA) 20 mM, por 30 min, na temperatura ambiente, e dentro de um compartimento escuro. Novamente, DTT 10 mM foi adicionado à amostra para bloquear o excesso de IAA. A amostra foi mantida por 10 min na temperatura ambiente e dentro de um compartimento escuro. A peçonha foi, então, digerida usando um protocolo com duas etapas: a digestão durante à noite a 37 °C com tripsina (Thermo Scientific Pierce Trypsin Protease, MS Grade), na proporção 1:50 (enzima:substrato), seguida por uma segunda digestão usando as

mesmas enzima e temperatura, mas na proporção 1:100, durante 3 h, em acetonitrila (ACN) 80% (concentração final). Peptídeos trópticos foram dessalinizados usando ZipTip C18 (Merck Millipore, Alemanha) como descrito previamente (COTTO-RIOS *et al.*, 2012).

O sistema cromatográfico *2D NanoAcquity UPLC* (Waters, Reino Unido) foi equipado com a coluna capilar monolítica *PepSwift* (100  $\mu\text{m}$  x 25 cm, Thermo Scientific) equilibrada com solução A (ácido fórmico 0,1%). Os peptídeos foram eluídos em 97 min seguindo um gradiente (3-70%) de solução B (ACN 99,8% e ácido fórmico 0,1%) sob vazão de 1  $\mu\text{L}/\text{min}$ . Todas as análises de espectrometria de massas foram feitas no espectrômetro *Q Exactive™ Plus* (Thermo Scientific) em uma aquisição dependente de dados, que automaticamente realizou os experimentos de MS/MS nos 12 íons mais intensos de cada varredura MS. Espectros MS de alta resolução foram adquiridos com resolução de 70.000 (em  $m/z$  200) e controle automático de ganho alvo (*automatic gain control target*, *AGC target*) de  $3e6$ . Subsequentemente, espectros HCD MS/MS foram adquiridos no analisador *Orbitrap* com resolução de 17.500, *AGC target* de  $1e5$ , energia de colisão normalizada de 25 e janela de isolamento de  $\pm 2 m/z$ .

Os dados brutos foram submetidos ao *software* Peaks 8 (Bioinformatics Solutions Inc., Canadá), para realização do sequenciamento automático *de novo* dos fragmentos trópticos, gerando marcadores de sequência (*sequence tags*) de alta qualidade. Essas sequências foram utilizadas pelo algoritmo do Peaks para pesquisa em dois bancos de dados: i) o banco de dados do UniProt (UNIPROT CONSORTIUM, 2015) contendo 67.053 sequências encontradas com a palavra-chave “Serpentes (taxid: 8570)” e acessado no dia 05/07/2017; e ii) o banco de dados do transcriptoma de Cdt contendo as 97.474 sequências montadas obtidas neste estudo. Para ambos os bancos de dados, foram utilizadas duas diferentes abordagens: “*PEAKS database search*” e “*SPIDER*”. A tolerância de massa foi configurada em 10 ppm e 0,5 Da para os íons-*pai* e fragmentos, respectivamente. Oxidação (His, Trp e Met) e formação de piro-glutamato N-terminal (Glu, Gln) foram configurados como modificações variáveis enquanto carbamidometilação (Cys) foi mantida como modificação fixa. A confiança local média (*average local confidence*, *ALC*) foi estabelecida em  $\geq 70\%$ . Um banco de dados *decoy* foi usado para calcular o *false discovery rate* (FDR) configurado para ser  $< 1\%$ . Foram considerados como proteínas as sequências com pelo menos 1 peptídeo único e sua abundância foi estimada pelo “*normalized spectral abundance factor*” (NSAF) (ZYBAILOV *et al.*, 2006).

#### *1.3.4.2 Fracionamento da peçonha de Cdt e sequenciamento N-terminal*

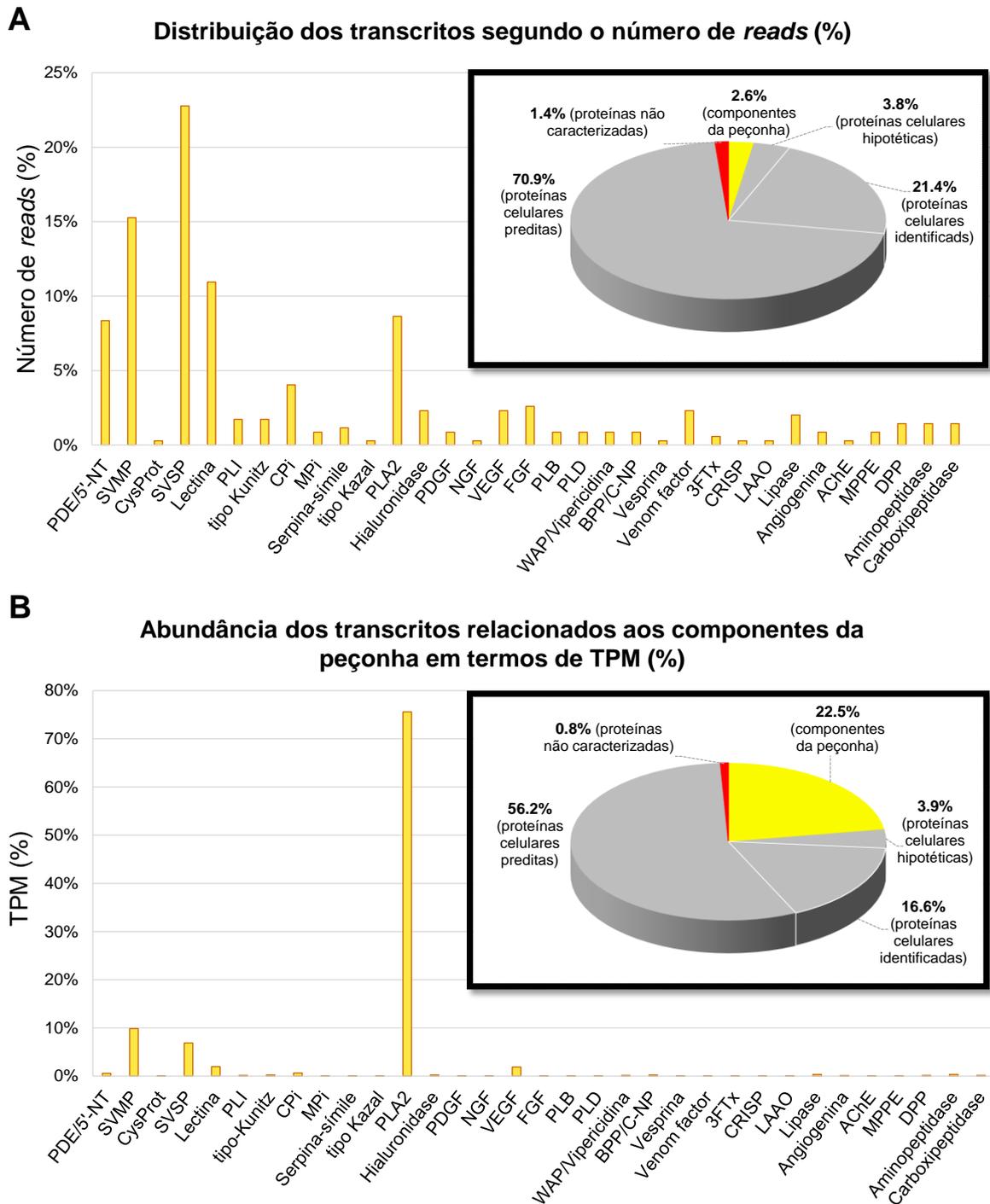
A peçonha bruta de Cdt foi dissolvida em uma solução de ACN 5% e ácido trifluoroacético (TFA) 0,05%, centrifugada (13,000 *xg*, temperatura ambiente, 10 min), e o sobrenadante contendo 2 mg de proteína foi aplicado em uma coluna de fase reversa com resina C18 Vydac 218MS (5  $\mu$ m, 250 x 4.6 mm, GRACE, EUA). As frações foram monitoradas em 214 nm pelo sistema Äkta UPC-900 (GE Healthcare, Suécia) e eluídas exatamente como previamente descrito (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010). O sequenciamento N-terminal das frações de interesse foi realizado no sequenciador automático de proteínas PPSQ-33A (Shimadzu Co., Japão) através do método da degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967).

## **1.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 1.4.1 Análise geral do perfil de expressão da glândula de peçonha e seu proteoma

Foi sequenciado um total de 126.795.246 e 113.366.578 de *reads* brutas de cada replicata, considerando ambas as *reads* (*forward* e *reverse*). A análise de qualidade revelou que a maioria das sequências apresentou *Phred score* maior que 30 em ambas as replicatas. Após a etapa de trimagem, foram obtidos 124.192.676 e 110.401.122 *reads* de alta qualidade de cada replicata, que foram montados *de novo* em 97.474 *contigs*. A distribuição do tamanho dos *contigs* foi de 201-28.989 pb, com um tamanho médio de 872,67 pb. Destes, 76.077 *contigs* (78%) foram mapeados no genoma de *C. horridus* enquanto 10.308 *contigs* (11%) foram encontrados no transcriptoma de *C. adamanteus*.

A ferramenta TransDecoder fez a predição de 31.135 ORFs entre todos os *contigs* montados e 13.643 *contigs* foram funcionalmente anotados. Aproximadamente 96% dos *contigs* representam proteínas celulares (Figura 1.2A-insero), principalmente relacionadas ao metabolismo celular, incluindo processos de transcrição e tradução, como revelado pela distribuição seguindo a classificação de ontologia gênica (GO, APÊNDICE). Os componentes de peçonha correspondem a 2,6% do total de transcritos anotados (Figura 1.2A-insero) e foram agrupados em diferentes famílias de proteínas (Figura 1.2A). A abundância dos transcritos na glândula de peçonha de Cdt foi resumida para melhor visualização na Figura 1.2B e está detalhada nas tabelas 1.1 e 1.2.



**Figura 1.2 – O transcriptoma da glândula de peçonha de *C. d. terrificus*.** **A)** Distribuição dos transcritos relacionados aos componentes da peçonha. Os transcritos foram agrupados em diferentes famílias de proteínas. Inseto: visão geral da distribuição dos transcritos. **B)** Estimativa da abundância de cada família de proteínas da peçonha no transcriptoma. Inseto: visão geral da abundância de todos os transcritos. Abreviações: 3FTx: toxina *three-finger*; 5'-NT: 5'-nucleotidase; AChE: acetilcolinesterase; BPP/C-NP: peptídeo potencializador de bradicinina/peptídeo natriurético do tipo C; CPi: inibidor de CysProt; CRISP: proteína secretória rica em cisteína; CysProt: cisteíno-protease; DPP: dipeptidil peptidase; FGF: fator de crescimento de fibroblastos; LAAO: L-aminoácido oxidase; MPi: inibidor de metaloprotease; MPPE: metalofosfoesterase; NGF: fator de crescimento neural; PDE: fosfodiesterase; PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; PLB: fosfolipase B; PLD: fosfolipase D; PLI: inibidor de PLA<sub>2</sub>; SVMp: metaloproteases de peçonha de serpente; SVSP: serinoproteases de peçonha de serpente; VEGF: fator de crescimento do endotélio vascular; WAP: waprina-símile.

Tabela 1.1 – Visão geral do venoma de *C. d. terrificus*. A abundância está expressa como TPM no transcriptoma da glândula de peçonha e como NSAF no proteoma da peçonha.

Proteína	Abundância no transcriptoma		Abundância no proteoma da peçonha (%) de acordo com cada banco de dados e abordagem			
	TPM (valor absoluto)	TPM (%)	Serpentes		Transcriptoma (este estudo)	
			PEAKS	SPIDER	PEAKS	SPIDER
Componentes da peçonha	544725,053	22,4804	97,048	98,636	89,220	85,669
Proteínas celulares	1858640,501	76,7045	2,952	1,364	2,257	3,842
Não caracterizados ou determinados	19752,200	0,8152	-	-	8,523	10,489

TPM: transcritos por milhão; NSAF: *normalized spectral abundance factor*.

Os transcritos de proteínas celulares somam ~76% dos transcritos totais em abundância enquanto aqueles relacionados a componentes da peçonha correspondem a ~22% (Tabela 1.1, Figura 1.2B-inserto). Entre os transcritos relacionados à peçonha, mais de 96% codificam fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), metaloproteases de peçonha de serpente (SVMP), serinoproteases de peçonha de serpente (SVSP), fator de crescimento do endotélio vascular (VEGF) e lectina. Além disso, apenas a PLA<sub>2</sub> é responsável pela abundância de ~75% entre os componentes da peçonha, constituindo-se a família de maior representação (Figura 1.2, Tabela 1.2). Os valores de TPM para cada família de componente da peçonha estão listados na Tabela 1.2.

As *reads* trimadas estão disponíveis no repositório de dados do ENA sob o número de acesso de estudo PRJEB1986 (<http://www.ebi.ac.uk/ena/data/view/PRJEB19865>). Os *contigs* de interesse montados (com tamanho superior a 200 pb) foram atribuídos aos acessos HAGK01000001-HAGK01000074 e HALL01000001-HALL01000005. A Tabela 1.3 apresenta as características previstas para essas sequências, nomeadas seguindo a estrutura “Cdt + classe de proteína + isoforma” como o exemplo CdtHya1, que significa “hialuronidase 1 de *C. d. terrificus*”.

Tabela 1.2 – Abundância de cada família de componentes da peçonha no transcriptoma e no proteoma de *C. d. terrificus*.

Família de proteína	Abundância no transcriptoma		Abundância no proteoma da peçonha (%) segundo cada banco de dados			
	TPM (valor absoluto)	TPM (%)	Serpentes		Transcriptoma (este estudo)	
			PEAKS	SPIDER	PEAKS	SPIDER
Acetilcolinesterase	11,496	0,0021	-	-	-	-
Aminopeptidase	1871,335	0,3435	0,004	0,001	0,016	0,003
Angiogenina	626,237	0,1150	-	-	-	-
BPP/C-NP	1219,828	0,2239	0,011	0,003	-	-
Carboxipeptidase	849,244	0,1559	0,035	0,010	0,073	0,173
CPi	3462,089	0,6356	-	-	-	-
CRISP	0,821	0,0002	-	-	0,032	0,007
CysProt	108,814	0,0200	-	-	-	-
Desintegrina	-	-	0,227	0,946	-	-
Dipeptidilpeptidase	910,689	0,1672	-	-	-	-
FGF	187,855	0,0345	-	-	-	-
Hialuronidase	1233,961	0,2265	0,045	0,012	0,085	0,235
<i>Tipo Kazal</i>	0,499	0,0001	-	-	-	-
<i>Tipo Kunitz</i>	1286,222	0,2361	-	-	-	-
LAO	166,597	0,0306	-	-	-	-
Lectina	10656,487	1,9563	0,026	0,007	0,042	0,009
Lipase	1840,323	0,3378	-	-	-	-
MPi	351,596	0,0645	-	-	-	-
Metalofosfoesterase	1,516	0,0003	-	-	-	-
NGF	116,336	0,0214	0,152	0,060	-	-
PDE/5'-NT	3191,833	0,5860	0,398	0,208	1,101	0,647
PDGF	1,151	0,0002	-	-	-	-
PLA <sub>2</sub>	411785,200	75,5951	89,431	90,184	56,235	52,900
PLB	450,792	0,0828	0,044	0,012	0,192	0,184
PLD	109,919	0,0202	-	-	-	-
PLI	934,652	0,1716	0,073	0,028	0,464	0,303
Serpina-símile	113,719	0,0209	-	-	-	-
SVMP	53674,420	9,8535	5,875	5,505	15,903	32,013
SVSP	37468,393	6,8784	1,426	0,749	22,238	11,450
Toxina 3-finger	311,030	0,0571	-	-	-	-
Viperidina	207,782	0,0381	-	-	-	-
VEGF	10337,152	1,8977	2,251	2,276	3,620	2,077
<i>Venom factor</i>	178,269	0,0327	-	-	-	-
Vesprina	284,155	0,0522	-	-	-	-
Waprina-símile	774,639	0,1422	-	-	-	-

A abundância está expressa como TPM (transcritos por milhão) no transcriptoma e como NSAF (*normalized spectral abundance factor*). A porcentagem dos transcritos relacionados a toxinas foi calculada considerando 100% a soma dos TPMs individuais.

Tabela 1.3 – Predição das características de *contigs* montados a partir do transcriptoma de *C. d. terrificus*.

Família da proteína	Nome da proteína	Acesso	Tamanho (aminoácidos)	Peptídeo sinal <sup>b</sup> (número de resíduos)	Massa molecular (Da) <sup>a</sup>
SVSP	CdtSP23	HAGK01000001	372	19	40285,02
SVCP	CdtCysProt1	HAGK01000002	393	nd	44486,57
CLP	Snaclec crotocetin 2	HAGK01000003	148	23	14482,48
CLP	Snaclec crotocetin 3	HAGK01000004	148	23	14482,48
CLEC	CdtGALEC1	HAGK01000005	171	nd	19154,95
CLEC	CdtGALEC2	HAGK01000006	109	nd	11991,10
CLEC	CdtGALEC3	HAGK01000007	73	nd	8050,96
CLEC	CdtCLEC1	HAGK01000008	161	22	15895,64
CLEC	CdtCLEC2	HAGK01000009	161	22	15798,48
CLEC	CdtCLEC3	HAGK01000010	158	23	15849,78
PLB	CdtPLB1	HAGK01000011	553	nd	64104,22
PLB	CdtPLB2	HAGK01000012	520	nd	60433,91
PLB	CdtPLB3	HAGK01000013	566	21	61389,56
PLD	CdtPLD1	HAGK01000014	245	nd	28624,08
PLD	CdtPLD2	HAGK01000015	294	nd	33309,22
PLD	CdtPLD3	HAGK01000016	103	nd	12039,81
KUN	CdtKunitz-type1	HAGK01000017	252	20	25916,37
KUN	CdtKunitz-type2	HAGK01000018	513	25	54989,85
KUN	CdtKunitz-type3	HAGK01000019	96	25	7459,24
KAZ	CdtKazal-type	HAGK01000020	196	nd	21831,70
Serpin	CdtSerpin-like	-	54	nd	5990,87
Serpin	CdtNeuroserpin	HAGK01000021	162	nd	18613,90
CYS	CdtCystatin1	HAGK01000022	139	22	13242,06
PLI	CdtPLI1	HAGK01000023	172	19	17132,37
PLI	CdtPLI2	HAGK01000024	332	23	35043,12
PLI	CdtPLI3	HAGK01000025	332	23	35010,11
PLI	CdtPLI4	HAGK01000026	237	nd	25238,50
PLI	CdtPLI5	HAGK01000027	231	nd	24479,74
svMPI	CdtMPi1	HAGK01000028	212	24	21676,16
svMPI	CdtMPi2	HAGK01000029	206	18	21676,16
svMPI	CdtMPi3	HAGK01000030	220	26	21749,82
EI	CdtWPIKN	HAGK01000031	509	nd	57125,26
5'-NT	Cdt5'-NT1	HAGK01000032	588	nd	64697,06
5'-NT	Cdt5'-NT2	HAGK01000033	570	nd	65659,33
PDE	CdtPDE1	HAGK01000034	887	nd	101279,98
PDE	CdtPDE2	HAGK01000035	859	nd	98202,64
PDE	CdtPDE3	HAGK01000036	898	nd	102183,89
svVEGF	CdtVEGF1	HAGK01000037	192	26	19497,52
svVEGF	CdtVEGF2	HAGK01000038	148	26	14239,50

Família da proteína	Nome da proteína	Acesso	Tamanho (aminoácidos)	Peptídeo sinal <sup>b</sup> (número de resíduos)	Massa molecular (Da) <sup>a</sup>
svVEGF	CdtVEGF3	HAGK01000039	421	16	45888,43
svVEGF	CdtVEGF4	HAGK01000040	144	24	13558,63
FGF	CdtFGF fragment 1	HAGK01000041	105	nd	11763,38
FGF	CdtFGF fragment 2	HAGK01000042	189	nd	21822,83
FGF	CdtFGF fragment 3	-	27	nd	2807,05
Hyal	CdtHya1	HAGK01000043	449	20	49629,83
Hyal	CdtHya2	HAGK01000044	449	20	49672,86
Hyal	truncated CdtHya3	HAGK01000045	339	20	36859,77
Hyal	CdtHya4	HAGK01000046	177	nd	20839,87
Hyal	CdtHya5	HAGK01000047	343	nd	40013,77
Hyal	CdtHya6	HAGK01000048	470	nd	53929,64
CRISP	CdtCRISP-1	HAGK01000049	240	19	24670,96
CRIP	CdtCRIP1	HAGK01000050	207	nd	22865,27
CRIP	CdtCRIP2	HAGK01000051	78	nd	8821,07
CRIP	CdtCRIP3	HAGK01000052	106	nd	11926,80
CGRP	CdtCGRP	HAGK01000053	71	nd	7546,57
CHRP	CdtCHRP	HAGK01000054	145	nd	17020,67
LAAO	Bordonein-L	HAGK01000055	516	18	56925,51
Vespryn	CdtVespryn	HAGK01000056	218	nd	24207,88
3FTx	Cdt3FTx	HAGK01000057	86	21	7233,26
Viperigidin	CdtViperigidin	HAGK01000058	125	22	11292,57
Waprin-like	CdtWAP-like	HAGK01000059	78	nd	8451,08
VF	CdtVF fragment 1	HAGK01000060	90	nd	9803,31
VF	CdtVF fragment 2	HAGK01000061	148	nd	16571,84
VF	CdtVF fragment 3	HAGK01000062	67	nd	7675,86
VF	CdtVF fragment 4	HAGK01000063	122	nd	13274,38
VF	CdtVF fragment 5	HAGK01000064	135	nd	14927,89
VF	CdtVF fragment 6	HAGK01000065	319	nd	35407,49
VF	CdtVF fragment 7	HAGK01000066	133	nd	14913,96
VF	CdtVF fragment 8	HAGK01000067	400	nd	45774,90
MPPE	CdtMPPE1	HAGK01000068	190	nd	21693,33
MPPE	CdtMPPE2	HAGK01000069	106	nd	11842,64
AP	CdtAPA	HAGK01000070	958	nd	109861,72
APN	CdtAPN1	HAGK01000071	980	nd	110858,12
DPP	CdtDPPII	HAGK01000072	358	19	38302,10
DPP	CdtDPPIV	HAGK01000073	81	nd	9287,43
Lipase	CdtLIP1	HAGK01000074	101	nd	11570,90
Lipase	CdtLIP2	-	35	nd	4028,84
FGF	CdtFGF	HALL01000001	221	nd	25679,48
AChE	CdtAChE	HALL01000002	609	nd	69199,49
CBP	CdtCBP1	HALL01000003	480	22	51655,72
CBP	CdtCBP2	HALL01000004	541	nd	61622,91

Família da proteína	Nome da proteína	Acesso	Tamanho (aminoácidos)	Peptídeo sinal <sup>b</sup> (número de resíduos)	Massa molecular (Da) <sup>a</sup>
PLA <sub>2</sub>	CdtPLA <sub>2</sub> (group IID)	HALL01000005	145	20	14323,42

Sequências contendo mais 200 pb foram submetidas ao European Nucleotide Archive.

<sup>a</sup> Massa molecular predita (GASTEIGER *et al.*, 2005) desconsiderando a sequência do peptídeo sinal

<sup>b</sup> O peptídeo sinal foi predito pela ferramenta SMART (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015)

Abreviações: nd: não determinado; svSP: serinoproteases de peçonha de serpente; svCP: cisteinoprotease de peçonha de serpente; CLP: proteína lectina do tipo-C-símile; CLEC: lectina do tipo-C; PLB: fosfolipase B; PLD: fosfolipase D; KUN: inibidor de protease do tipo Kunitz; KAZ: inibidor de protease do tipo Kazal; PLI: inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub>; svMPI: inibidor de metaloproteases de peçonha de serpente; EI: inibidor enzimático; CYS: cistatina; 5'-NT: nucleotidase; PDE: fosfodiesterase; svVEGF: fator de crescimento do endotélio vascular de peçonha de serpente; FGF: fator de crescimento de fibroblasto; Hyal: hialuronidase; CRIP: proteína intestinal rica em cisteína; CRISP: proteína secretória rica em cisteína; CGRP: proteína rica em cisteína e glicina; CHRP: proteína rica em cisteína e histidina; LAAO: L-aminoácido oxidase; 3FTx: toxina *three-finger*; VF: *venom factor*; MPPE: metalofosfoesterase; APA: aminopeptidase A; APN: aminopeptidase N; DPP: dipeptidilpeptidase; AChE: acetilcolinesterase; PLA<sub>2</sub>: fosfolipase A<sub>2</sub>; CBP: carboxipeptidase.

Os resultados de MS/MS foram pesquisados contra dois bancos de dados (“Serpentes” e o transcriptoma de Cdt obtido neste estudo) e a abundância das proteínas identificadas foi estimada utilizando o método NSAF. Os componentes presentes na peçonha foram identificados usando as abordagens *PEAKS database search* e *SPIDER* no *software* Peaks para ambos os bancos de dados descritos acima. A primeira abordagem permite a identificação de sequências de peptídeos idênticos ao banco fornecido ou que apresentem algumas modificações pré-definidas (por exemplo, carbamidometilação de Cys, oxidação de Met/Trp, deamidação de N/Q) incorporando resultados de sequenciamento *de novo* (ZHANG *et al.*, 2012). Por outro lado, utilizando o *SPIDER*, é possível identificar mutações e modificações pós-traducionais (PTMs) em peptídeos assim como buscas por homologia (HAN; MA; ZHANG, 2005).

Os resultados obtidos de ambos os bancos de dados foram filtrados, aceitando apenas proteínas com, pelo menos, 1 peptídeo único e FDR  $\leq 1\%$  para evitar redundância nas identificações devido a peptídeos compartilhados por diferentes isoformas de proteínas (NESVIZHISKII; AEBERSOLD, 2005). É interessante lembrar que, uma vez que peçonhas de serpentes são compostas por muitas proteoformas altamente similares entre si (MELANI *et al.*, 2016), essa escolha pode desconsiderar aquelas proteínas com alto grau de identidade cujo peptídeo único pode não ser detectado.

Além disso, neste estudo, o uso da abordagem *SPIDER* gerou a identificação de grande número de espectros, peptídeos e proteínas, que permitiriam a avaliação de PTMs e substituições de aminoácidos. No entanto, resultados falso positivos ainda foram detectados

mesmo após checagem manual dos resultados e configuração do FDR  $\leq 1\%$ . Portanto, a abordagem *PEAKS database search* foi a escolhida para expressar os resultados em relação aos transcritos identificados na peçonha.

Proteínas não caracterizadas ou não determinadas foram identificadas apenas utilizando o banco de dados do transcriptoma e variou de 8,5-10,5% do proteoma da peçonha (Tabela 1.1). Proteínas celulares foram pouco abundantes na peçonha (1,3-3,9%), sendo a maioria do proteoma (85-99%) composto por verdadeiros componentes da peçonha/toxinas (Tabela 1.1).

Entre os componentes da peçonha, existe uma dominância da família de PLA<sub>2</sub> (predominantemente cadeias ácidas e básicas da crotoxina), SVMP (principalmente classes P-II e P-III), SVSP (em especial, enzimas trombina-símile) e VEGF (VEGF-A e VEGF-F). Componentes minoritários da peçonha incluem a família das fosfodiesterases e 5'-nucleotidasas (PDE/5'-NT), aminopeptidase, peptídeo potencializador de bradicinina/peptídeo natriurético do tipo C (BPP/C-NP), carboxipeptidase, desintegrina, hialuronidase, lectina, fator de crescimento neural (NGF), fosfolipase B (PLB) e inibidor de PLA<sub>2</sub> (PLI). A abundância de cada classe de proteínas usando ambos os bancos de dados e abordagens está resumida na Tabela 1.2 e foi comparada à abundância no transcriptoma.

Também foram investigados quais transcritos identificados no estudo foram verdadeiramente expressos no proteoma. A Tabela 1.4 mostra todos os transcritos relacionados à peçonha identificados no proteoma, incluindo os transcritos que compartilham o mesmo grupo de peptídeos. Para esses últimos, o NSAF foi calculado apenas uma vez para evitar a duplicidade no cálculo da abundância.

Entre os 7 transcritos mais expressos relacionados a componentes da peçonha (destacados em negrito na Tabela 1.4), estão 4 transcritos codificadores de PLA<sub>2</sub> responsáveis por 74% do TPM das proteínas da peçonha e 56% da abundância no proteoma. Os outros 3 transcritos pertencem às famílias SVMP, SVSP e VEGF e correspondem juntos a ~7% do TPM e ~17% das proteínas da peçonha.

Tabela 1.4 – Transcritos relacionados a componentes da peçonha identificados no proteoma.

Proteína	Identificação do transcrito ( <i>transcript ID</i> )	TPM	TPM (%)	Tamanho (pb)	-10lgP	#Pep	#Unique	Cobertura (%)	#Spec	NSAF (%)		PTM
										Transcrito individual	Família	
PLA <sub>2</sub> (CA)	TRINITY_DN18351_c14_g1_i1	135594,000	24,8921	1045	467,88	121	95	32	999	26,610	56,235	1
PLA <sub>2</sub> (CB)	TRINITY_DN18351_c4_g1_i1	160754,000	29,5110	202	302.1	49	15	98	142	19.568		1
PLA <sub>2</sub> (CB)	TRINITY_DN18351_c14_g2_i1	59126,200	10,8543	688	240.79	23	22	20	58	2.347		1
PLA <sub>2</sub> (básica)	TRINITY_DN18351_c14_g1_i2	49677,500	9,1197	205	195.89	10	6	37	55	7.468		1
PLA <sub>2</sub> (CA)	TRINITY_DN5367_c1_g1_i1	210,335	0,0386	230	48.81	1	1	21	2	0.242		1
SVMP (P-II)	TRINITY_DN15400_c0_g7_i1	28497,200	5,2315	1550	411.98	105	82	51	564	10.129	15.903	1
SVMP	TRINITY_DN15400_c0_g3_i1	6833,590	1,2545	1208	306.34	28	14	25	55	1.267		1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN34943_c0_g1_i1	202,683	0,0372	533	207.56	12	10	47	29	1.515		1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN34943_c0_g2_i1	449,301	0,0825	531	207.56	12	10	47	29			1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN12419_c0_g6_i1	131,508	0,0241	477	187.84	10	3	25	19	1.109		1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN12419_c0_g3_i1	118,355	0,0217	476	187.84	10	3	25	19			1
SVMP	TRINITY_DN19179_c0_g1_i1	643,806	0,1182	415	161.16	8	6	46	13	0.872		1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN11324_c0_g3_i1	42,432	0,0078	217	127.05	4	1	36	6	0.770		1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN11324_c0_g3_i2	110,625	0,0203	220	127.05	4	1	35	6			1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN11324_c0_g4_i1	636,073	0,1168	236	127.05	4	1	33	6			1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN11324_c0_g1_i1	705,441	0,1295	240	127.05	4	1	32	6			1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN11324_c0_g2_i1	142,533	0,0262	241	127.05	4	1	32	6			1
SVMP (P-III)	TRINITY_DN20611_c0_g1_i1	349,935	0,0642	460	62.73	2	2	10	4	0.242		1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g4_i11	112,305	0,0206	627	227.67	17	3	44	43	1.909	22.238	1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g4_i12	547,086	0,1004	686	227.67	17	3	40	43			1
SVSP (giroxina)	TRINITY_DN18351_c16_g4_i15	122,416	0,0225	474	195.57	15	2	59	30	1.762		1
<b>SVSP giroxina</b>	<b>TRINITY_DN17493_c6_g9_i1</b>	<b>3279,220</b>	<b>0,6020</b>	<b>216</b>	<b>184.31</b>	<b>12</b>	<b>7</b>	<b>88</b>	<b>30</b>	<b>3.866</b>		1
SVSP (giroxina)	TRINITY_DN18351_c16_g4_i12	149,245	0,0274	451	168.12	11	3	38	23	1.420		1
SVSP	TRINITY_DN18351_c16_g3_i1	203,671	0,0374	295	166.37	8	1	82	18	1.698		1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g4_i2	261,470	0,0480	281	164,78	10	1	34	18	1.783		1

Proteína	Identificação do transcrito ( <i>transcript ID</i> )	TPM	TPM (%)	Tamanho (pb)	-10lgP	#Pep	#Unique	Cobertura (%)	#Spec	NSAF (%)		PTM
										Transcrito individual	Família	
SVSP (ativador de plasminogênio)	TRINITY_DN15864_c2_g4_i6	449,184	0,0825	257	159,19	7	1	40	21	2.275		1
SVSP	TRINITY_DN16107_c0_g1_i1	250,749	0,0460	406	147,71	7	1	33	20	1.371		1
SVSP (giroxina)	TRINITY_DN18351_c16_g4_i5	1256,900	0,2307	360	132,25	5	1	51	10	0.773		1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g4_i8	197,594	0,0363	541	157,31	6	4	34	11	0.566		1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g4_i1	155,806	0,0286	600	157,31	6	4	31	11			1
SVSP	TRINITY_DN12477_c2_g1_i5	420,980	0,0773	376	116,82	6	4	23	9	0,666		1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g1_i1	0,177	0,0000	240	112,37	5	2	42	5	0,580		1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g3_i1	1112,220	0,2042	240	112,37	5	2	42	5			1
SVSP (giroxina)	TRINITY_DN555_c0_g1_i1	1747,070	0,3207	216	111,13	5	2	38	12	1.546		2
SVSP (trombina-símile)	TRINITY_DN15888_c0_g2_i1	0,614	0,0001	208	107,56	4	1	29	8	1.071		1
SVSP	TRINITY_DN15888_c0_g7_i1	105,866	0,0194	213	107,56	4	1	28	8			1
SVSP	TRINITY_DN15888_c0_g3_i1	917,645	0,1685	229	107,56	4	1	26	8			1
SVSP	TRINITY_DN15888_c0_g5_i1	917,645	0,1685	229	107,56	4	1	26	8			1
SVSP	TRINITY_DN15888_c0_g6_i1	718,620	0,1319	234	107,56	4	1	26	8			1
SVSP ( <i>rhinocerase</i> )	TRINITY_DN15888_c0_g5_i2	393,116	0,0722	370	107,56	4	1	16	8			1
SVSP	TRINITY_DN15864_c2_g5_i1	98,125	0,0180	237	76,84	2	1	28	3	0.352		1
SVSP	TRINITY_DN16107_c1_g1_i1	226,925	0,0417	228	66,14	2	1	24	3	0.366		1
SVSP	TRINITY_DN18363_c10_g4_i2	944,143	0,1733	358	48,7	1	1	9	3	0.233		
SVSP	TRINITY_DN17760_c0_g1_i1	147,480	0,0271	202	48,7	1	1	16	3			
SVSP	TRINITY_DN18363_c10_g4_i1	142,039	0,0261	344	48,7	1	1	10	3			
<b>VEGF (VEGF-F)</b>	<b>TRINITY_DN51552_c0_g1_i1</b>	<b>9255,560</b>	<b>1,6991</b>	<b>1140</b>	<b>309,2</b>	<b>40</b>	<b>40</b>	<b>22</b>	<b>133</b>	<b>3.247</b>	3,620	1
VEGF	TRINITY_DN11645_c0_g1_i3	327,769	0,0602	3193	175,74	13	10	8	24	0,209		1
VEGF (VEGF A)	TRINITY_DN11645_c0_g1_i2	173,923	0,0319	1535	118,95	5	2	6	9	0,163		1
PDE	TRINITY_DN18095_c8_g1_i1	430,191	0,0790	2748	308,02	37	37	31	68	0,689	1,101	1
PDE	TRINITY_DN17177_c0_g1_i3	351,635	0,0646	3421	110,27	3	3	3	4	0,033		1

Proteína	Identificação do transcrito ( <i>transcript ID</i> )	TPM	TPM (%)	Tamanho (pb)	-10lgP	#Pep	#Unique	Cobertura (%)	#Spec	NSAF (%)		PTM
										Transcrito individual	Família	
PDE	TRINITY_DN17177_c0_g1_i1	0,000	0,0000	3577	110,27	3	3	3	4			1
PDE	TRINITY_DN17177_c0_g1_i2	157,565	0,0289	3661	110,27	3	3	3	4			1
PDE	TRINITY_DN17177_c0_g1_i4	9,560	0,0018	3668	110,27	3	3	3	4			1
5'-NT	TRINITY_DN17189_c0_g2_i1	381,651	0,0701	2787	252,27	22	22	22	38	0,380		1
Inibidor de PLA <sub>2</sub>	TRINITY_DN13588_c0_g1_i1	-	-	1320	195,33	11	11	22	22	0,464	0,464	1
PLB	TRINITY_DN13868_c0_g2_i1	205,182	0,0377	1742	171,95	9	9	12	12	0,192	0,192	1
PLB	TRINITY_DN13868_c0_g1_i1	219,537	0,0403	1841	171,95	9	9	12	12			1
Hialuronidase	TRINITY_DN18091_c1_g1_i1	376,325	0,0691	3266	157,97	5	5	6	10	0,085	0,085	1
Hialuronidase	TRINITY_DN18091_c1_g1_i3	135,244	0,0248	3285	157,97	5	5	6	10			1
Hialuronidase	TRINITY_DN18091_c1_g1_i2	301,736	0,0554	3297	157,97	5	5	6	10			1
CBP (CBP E)	TRINITY_DN3171_c0_g1_i1	574,531	0,1055	4033	129,69	5	5	5	6	0,041	0,073	1
CBP (CPVL)	TRINITY_DN4636_c0_g1_i1	-	-	1766	93,38	2	2	4	2	0,032		3
CBP (CPVL)	TRINITY_DN4636_c0_g2_i1	-	-	1767	93,38	2	2	4	2			3
APN	TRINITY_DN13932_c1_g1_i3	876,894	0,1610	3487	83,22	2	2	2	2	0,016	0,016	1
APN	TRINITY_DN13932_c1_g1_i2	13,843	0,0025	3514	83,22	2	2	2	2			1
APN	TRINITY_DN13932_c1_g1_i1	546,147	0,1003	3530	83,22	2	2	2	2			1
CRISP ( <i>catrin</i> )	TRINITY_DN51882_c0_g1_i1	0,821	0,0002	863	42,33	1	1	4	1	0,032	0,032	1
LEC (convulxina)	TRINITY_DN18585_c1_g1_i1	470,212	0,0863	666	41,42	1	1	4	1	0,042	0,042	1

A abundância dos transcritos está expressa como transcritos por milhão (TPM). A análise de MS/MS foi realizada utilizando a abordagem PEAKS. A cobertura está relacionada aos peptídeos identificados por MS/MS. Os transcritos mais abundantes estão destacados em negrito. Quando disponíveis, informações relacionadas às proteínas estão em parênteses.

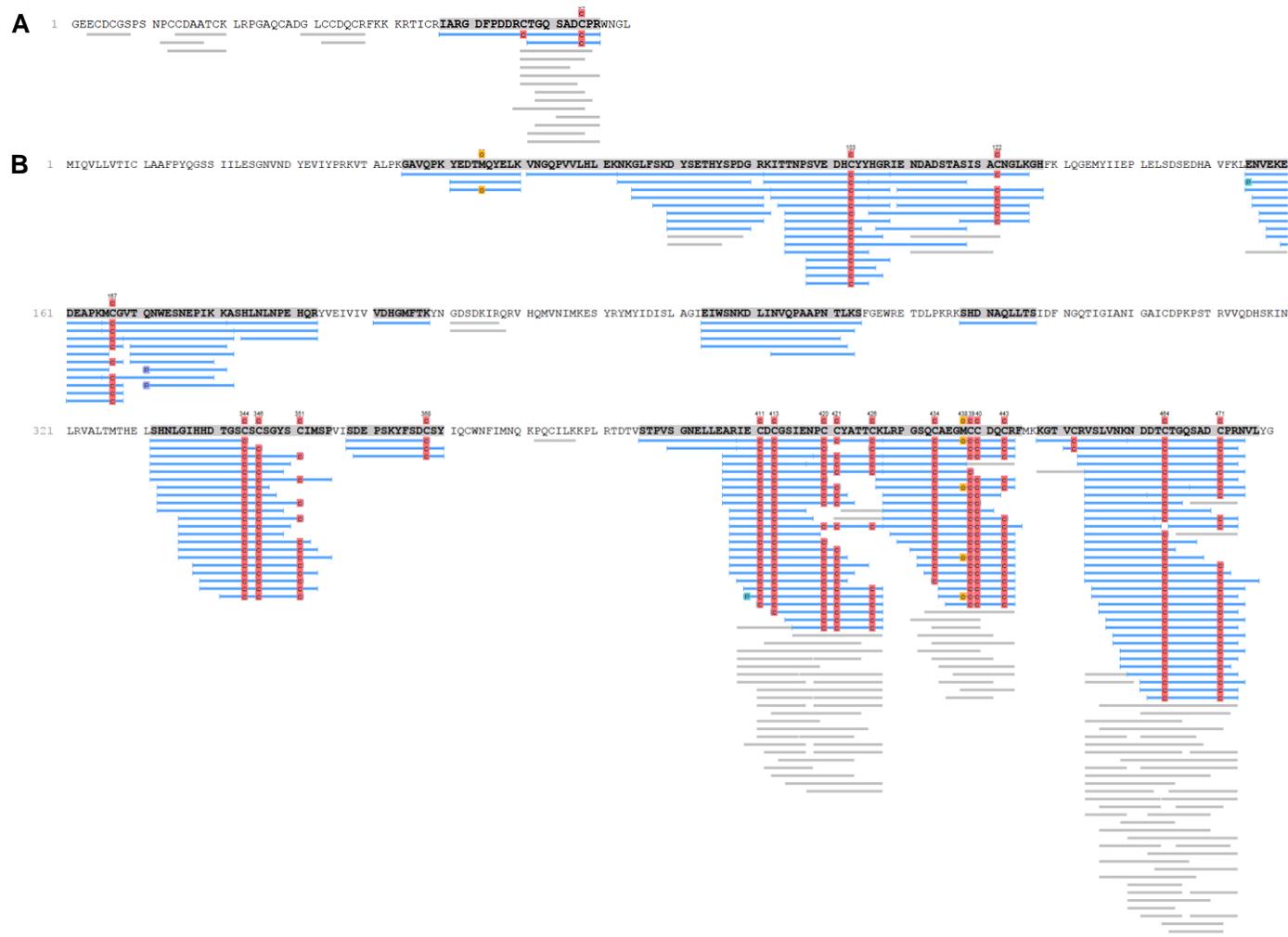
NSAF: *normalized spectral abundance factor*.

A porcentagem de TPM foi calculada considerando 100% como a soma dos TPM individuais para cada transcrito identificado.

-10lgP: *score* de confiança da proteína

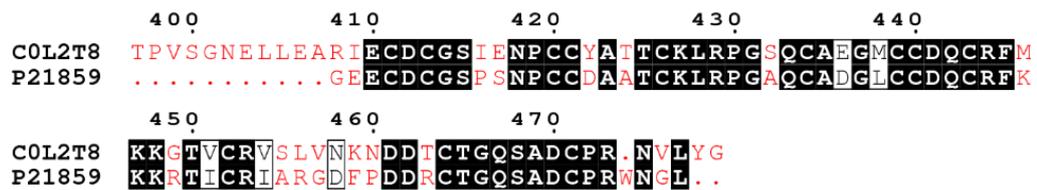
#Pep: número de peptídeos para cada transcrito; #Unique: número de peptídeos únicos para cada transcrito; #Spec: número de espectros MS/MS para cada transcritos

PTM: Modificações pós-traducionais identificadas. 1: Carbamidometilação; 2: Oxidação; 3: Piroglutamato de glutamina



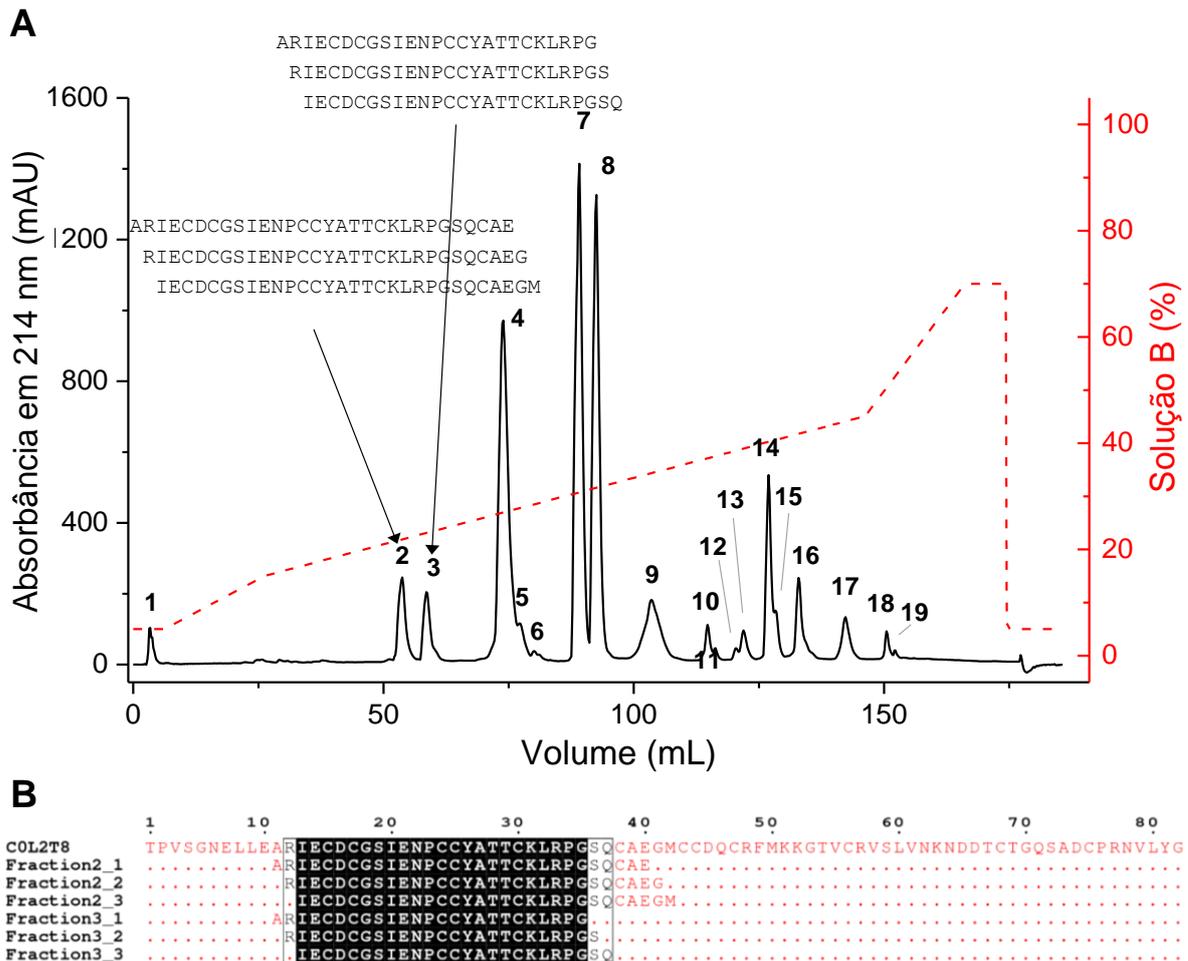
**Figura 1.3 – Desintegrinas no proteoma da peçonha de *C. d. terrificus*.** **A)** Desintegrina (sp|P21859) liberada de SVMP. **B)** Desintegrina (sp|COL2T8) identificada como região de SVMP. As barras azuis mostram os peptídeos identificados na pesquisa em bancos de dados e as barras cinzas representam aminoácidos consecutivos combinados entre sequências obtidas por sequenciamento automático *de novo* e pesquisa em bancos de dados. Resíduos de Cys estão carbamidometilados e representados por “C” dentro de uma caixa vermelha. Oxidação está indicada por “O” dentro de uma caixa alaranjada.

As desintegrinas foram identificadas como uma classe de proteínas apenas quando se utilizou o banco de dados “Serpentes”, mas outras sequências de desintegrina foram detectadas como regiões de SVMP (Tabela 1.2, Figura 1.3). Infere-se a partir desses resultados, adicionalmente aos transcritos relativamente abundantes relacionados a SVMP P-II (Tabela 1.4), que as desintegrinas presentes nessa peçonha são uma consequência, principalmente ou exclusivamente, de modificações pós-traducionais proteolíticas de SVMP. Além disso, peptídeos correspondentes a desintegrinas e aqueles que corresponderam à região desintegrina de SVMP foram alinhados e apresentam alta similaridade, como mostrado na Figura 1.4.



**Figura 1.4** – Alinhamento entre as sequências da SVMP P-II COL2T8 e a desintegrina P21859. Para a sequência COL2T8, está mostrado apenas o domínio desintegrina. O alinhamento foi gerado pela ferramenta *MultiAlin* e editado pelo servidor *ESPrpt*. Regiões de alto consenso estão destacadas em caixas pretas.

Adicionalmente ao LC-MS/MS de alta resolução, a CdtV foi fracionada por cromatografia de fase reversa e 19 frações majoritárias foram eluídas (Figura 1.5A). Os componentes eluídos nas frações 2 e 3 foram submetidos ao sequenciamento N-terminal e ambos mostraram homologia como o domínio desintegrina de uma SVMP P-II de *C. d. collilineatus* (sp|COL2T8), confirmando a presença de desintegrinas nessas frações (Figura 1.5B). Além disso, pode-se observar a alta proporção de crotoxina (~65%) representada pelas frações 4-8 (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2019) em acordo com os resultados obtidos nas abordagens transcriptômica e proteômica.



**Figura 1.5 – Identificação das desintegrinas na peçonha de *C. d. terrificus*.** **A)** Fracionamento da CdtV que foi aplicada em uma coluna C18 de fase-reversa e as frações foram eluídas como publicado previamente por Boldrini-França e colaboradores (2010). A absorbância das amostras foi monitorada em 214 nm e o N-terminal das frações de interesse foi sequenciado por degradação de Edman. **B)** Alinhamento de múltiplas sequências entre as desintegrinas identificadas no fracionamento da peçonha e o domínio desintegrina da SVMP P-II de *C. d. collilineatus* (sp|COL2T8). O alinhamento foi gerado pela ferramenta *Clustal Omega* e editado pelo servidor *ESPrpt*. Regiões de alto consenso estão destacadas em caixas pretas.

### 1.4.2 Abordagem integrativa da glândula de peçonha

Nos últimos anos, a integração de dados provenientes de abordagens de ponta, como proteoma, transcriptoma e genoma, tem se tornado a estratégia preferida dos toxinologistas (KAAS; CRAIK, 2015). O transcriptoma de uma glândula de peçonha revela uma fotografia da expressão recente de genes que codificam componentes da peçonha, podendo auxiliar na caracterização de vários domínios de transcritos, que são raramente detectados por análises proteômicas (SUNAGAR *et al.*, 2016). No entanto, essa abordagem falha na caracterização de PTMs e não pode fornecer sempre evidências quantitativas acuradas como as alcançadas por

estratégias proteômicas (KAAS; CRAIK, 2015; SUNAGAR *et al.*, 2016). Além disso, dados de análises proteômicas podem ser úteis para corrigir e confirmar as etapas de montagem e anotação de transcriptomas.

Neste estudo, sequências de alta qualidade obtidas através de MS/MS *shotgun* foram usadas como marcadores para pesquisa contra dois diferentes bancos de dados. A seleção do banco de dados ideal é uma tarefa desafiadora. Por um lado, o banco de dados do transcriptoma fornece uma abordagem verdadeiramente integrativa para identificar quais componentes da peçonha estão certamente sendo expressos na glândula de peçonha. Em contrapartida, esse banco de dados pode faltar nos transcritos não identificados devido a alguma falha experimental, afetando a identificação por MS/MS. Além disso, a qualidade da identificação dos peptídeos utilizando o banco de dados do transcriptoma está intrinsecamente relacionada à qualidade dos dados sequenciados (NESVIZHSKII, 2007).

Com relação ao banco de dados “Serpentes”, este é muito útil para identificar componentes cuja identificação foi prejudicada pelas sequências do transcriptoma, como, por exemplo, aqueles cDNA não detectados ou transcritos identificados como pequenos fragmentos. No entanto, como se trata de um enorme banco de dados, pode conter muitas sequências redundantes, a informação a respeito de alguns componentes da peçonha pode ser perdida e o número de identificações falsas pode aumentar (NESVIZHSKII, 2007).

Outra questão desafiadora nas análises proteômicas é a quantificação das proteínas identificadas. Muitos métodos para a quantificação de proteínas em análises MS/MS estão disponíveis atualmente. Cada um deles carrega suas particularidades, mas nenhum está livre de erros e não se existe um método universal para quantificação de proteínas (BANTSCHIEFF *et al.*, 2012; CALDERÓN-CELIS; ENCINAR; SANZ-MEDEL, 2018). O NSAF, método utilizado neste estudo, considera o número de espectros identificando uma proteína e o tamanho desta, uma vez que proteínas maiores tendem a apresentar mais peptídeos do que as menores (ZYBAILOV *et al.*, 2006).

Peçonhas animais são amostras ricas em proteína e sua produção pelas glândulas de peçonha é um processo às custas de energia (MORGENSTERN; KING, 2013). A peçonha de Cdt foi extraída 3 dias antes do sacrifício do animal a fim de se obter a maior quantidade de RNAm (LUNA *et al.*, 2013; PAINE *et al.*, 1992). A enorme abundância de transcritos relacionados a proteínas celulares está intrinsecamente relacionada à complexidade do tecido da glândula e à intensa atividade metabólica em seu interior. Um estudo recente mostrou que

muitas proteínas celulares estão presentes no estágio ativado da glândula de peçonha provavelmente envolvidas na produção de suas toxinas (LUNA *et al.*, 2013). A seguir, são discutidas as famílias de proteínas identificadas tanto no transcriptoma como no proteoma.

**Fosfolipases.** Foram identificados 30 transcritos (8,6%) codificadores de PLA<sub>2</sub> (Figura 1.2A), que apresentam o maior valor de TPM (411785,2; Figura 1.2B, Tabela 1.2), e são, disparadamente, a família de proteínas mais abundante neste transcriptoma com 75% de abundância nessa análise (Figura 1.2B, Tabela 1.2). As sequências foram identificadas como PLA<sub>2</sub> homólogas às subunidades ácida e básica da crotoxina e suas isoformas e também como PLA<sub>2</sub> secretória do grupo IIE (A0A1J0R065). Muitos transcritos de PLA<sub>2</sub> foram identificados, mas eles são fragmentos em sua maioria, levando à melhor identificação quando foi utilizado o banco de dados “Serpentes”, e a alta proporção de PLA<sub>2</sub> está de acordo com outros estudos já publicados (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; CALVETE *et al.*, 2010; MARGRES *et al.*, 2014). Nas peçonhas crotálicas, PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas (subunidade básica, CB) estão associadas de forma não covalente a um componente ácido (CA), não tóxico e não enzimático, para formar a crotoxina, o maior componente da peçonha de *C. d. terrificus* (FAURE *et al.*, 1994). Interessantemente, embora existam muitos transcritos relacionados a PLA<sub>2</sub>, apenas 4 deles representam cadeias ácidas e básicas da crotoxina e ~43% dos componentes do proteoma (Tabela 1.4).

Com relação às PLBs, foram obtidos 3 transcritos completos (CdtPLB1, CdtPLB2 e CdtPLB3) correspondendo a menos de 1% do número de transcritos (Figura 1.2A). As PLBs são fosfolipases que apresentam atividades tanto de PLA<sub>1</sub> como de PLA<sub>2</sub> (DOERY; PEARSON, 1964). Embora o primeiro relato de PLB em peçonha de serpente tenha sido feito há muito tempo atrás (DOERY; PEARSON, 1964) e diferentes peçonhas de serpente tenham demonstrado tal atividade (DOERY; PEARSON, 1964; MOHAMED; KAMEL; AYOBE, 1969), apenas a PLB de *P. colletti* foi isolada até o momento (BERNHEIMER *et al.*, 1987). A CdtPLB1 e a CdtPLB2 compartilham mais de 87% de identidade com outras PLBs de peçonhas de serpente (AIRD *et al.*, 2013; ROKYTA *et al.*, 2011). Já a CdtPLB3 compartilha aproximadamente 30% de identidade com as mesmas PLBs comparadas anteriormente, mas ~74% com uma PLB de *Alligator mississippiensis* (gi|1011583199). No proteoma, foram detectados peptídeos coincidindo com as mesmas regiões de CdtPLB1 e CdtPLB2, tornando

impossível distinguir se apenas CdtPLB1 ou CdtPLB2 ou se ambas as proteínas estão presentes na peçonha.

**Proteases.** Seus transcritos representam os mais abundantes em termos de número absoluto, mas sua abundância está muito abaixo da família das PLA<sub>2</sub> tanto no transcriptoma como no proteoma (Figura 1.2, Tabela 1.2). De forma similar ao ocorrido na família de PLA<sub>2</sub>, a maioria dos transcritos correspondentes a proteases foram detectados apenas como fragmentos.

**Metaloproteases e desintegrinas.** A classe das SVMP é a segunda mais abundante no transcriptoma (Figura 1.2B), estando representada principalmente pelas metaloproteases P-II e P-III, com ~15% em termos de números de transcritos relacionados à peçonha e 10% em abundância. Rokyta e colaboradores (2012) detectaram SVMP como a classe de toxina mais abundante em termos de *reads* totais no transcriptoma da glândula de peçonha de *C. adamanteus*.

As SVMP são sintetizadas como zimógenos que, posteriormente, sofrem processamento proteolítico para dar origem a diferentes subclasses de SVMP (P-I, P-II e P-III) de acordo com os motivos presentes em sua estrutura (FOX; SERRANO, 2008; PORTES-JUNIOR *et al.*, 2014). Até o momento, SVMP das subclasses P-II e P-III têm sido relatadas em serpentes *Crotalus* (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009, 2010; GEORGIEVA *et al.*, 2010; ROKYTA *et al.*, 2012). A presença de SVMP P-I no transcriptoma e no proteoma, mesmo em baixa abundância, indica que essa enzima também faz parte da peçonha de *C. d. terrificus* uma vez que peptídeos únicos foram identificados para essa proteína (resultados não mostrados).

É relevante a discussão e a identificação da família das desintegrinas. Algumas desintegrinas são o resultado do processamento proteolítico de SVMP P-II enquanto outras podem ser sintetizadas diretamente a partir de um RNAm precursor de desintegrina (FOX; SERRANO, 2008; SOTO *et al.*, 2006). Não foi encontrado nenhum transcrito codificando desintegrinas diretamente (essa pode ser a razão do porquê essa família não foi detectada no proteoma utilizando o banco de dados do transcriptoma), mas muitos peptídeos correspondentes a desintegrinas foram identificados usando o banco de dados “Serpentes”. Alguns desses peptídeos coincidiram com desintegrinas processadas de SVMP P-II, como, por exemplo, P21859 (Figura 1.3A). Adicionalmente, outras desintegrinas foram detectadas como regiões de

SVMP P-II (J3SBP9, E9NW26 e COL2T8), como exemplificado na figura 1.3B. As sequências de proteínas na figura 1.3 foram alinhadas e pode-se ver o alto grau de similaridade entre elas (Figura 1.4).

A presença das desintegrinas também foi investigada através do fracionamento da CdtV em uma coluna C18 exatamente como realizado por Boldrini-França e colaboradores (2010). As desintegrinas são polipeptídeos de baixa massa molecular (CALVETE *et al.*, 2005) eluídas no início do gradiente de ACN (20-25%) em uma cromatografia de fase reversa (LOMONTE; CALVETE, 2017). As frações 2 e 3 estão no mesmo volume de eluição que as desintegrinas já identificadas em outros proteomas de peçonhas de *C. durissus* (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2019). O N-terminal dos componentes de ambas as frações foi sequenciado, confirmando sua identidade. Os fragmentos obtidos são similares a outras desintegrinas crotálicas e idênticos ao domínio desintegrina de uma SVMP P-II (sp|COL2T8) de *C. d. collilineatus* (Figura 1.5B). Além disso, esses fragmentos também foram detectados no proteoma da peçonha de *C. d. collilineatus* (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010).

A SVMP COL2T8 não contém resíduos de Cys adicionais nos domínios *spacer* e desintegrina que preveniriam o processamento proteolítico e a liberação da região desintegrina (CHEN *et al.*, 2003). Esse processamento aumenta a complexidade da peçonha (FOX; SERRANO, 2008) e pode superestimar a proporção de SVMP na peçonha uma vez que a desintegrina liberada está depositada no banco de dados como SVMP P-II (Tabela 1.2). Isso pode ocorrer especialmente em análise de MS/MS *shotgun* em que ambos os domínios, metaloprotease e desintegrina liberada, estão presentes na mesma amostra. Consequentemente, após a pesquisa em bancos de dados, os peptídeos de ambos os domínios apresentam identidade com a mesma sequência de proteína depositada (por exemplo, COL2T8) e o resultado é mostrado como SVMP. Convém ressaltar que esse fato pode ser evitado realizando uma separação cromatográfica antes da análise MS/MS devido à prévia separação dos domínios metaloprotease e desintegrina que serão, posteriormente, analisados de forma isolada por MS/MS (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010).

Além disso, sugere-se que a presença de diferentes peptidases na glândula de peçonha (como amino e dipeptidilpeptidases) possa contribuir para aumentar a complexidade da peçonha por clivar a região N-terminal das desintegrinas, gerando novas proteoformas para essa família (Figura 1.5). Esse fato seria similar à origem de diferentes ponerinas na peçonha da formiga *Neoponera villosa* (COLOGNA *et al.*, 2018).

Considerando outras peçonhas do gênero *Crotalus*, foram detectados até 65% de SVMP nas peçonhas de serpentes adultas de *C. simus* e *C. d. cumanensis*. Em ambos os casos, alta proporção de desintegrinas (até 8,1%) também foi detectada (CALVETE *et al.*, 2010). No transcriptoma de *C. adamanteus*, SVMP P-II representa 15% da abundância dos transcritos totais, mas, analisando-se o proteoma, apenas 5% das proteínas são SVMP P-II e nenhuma desintegrina foi identificada (MARGRES *et al.*, 2014). No presente estudo, SVMP é ~9,8% dos transcritos de componentes da peçonha e ~15% em termos de abundância no proteoma (Tabela 1.2). No entanto, a proporção de desintegrinas foi estimada em ~7% a partir do fracionamento da peçonha, mostrando claramente a complexidade que pode ser gerada devido à presença de metaloproteases em peçonhas de serpentes.

**Serinoproteases.** As SVSP também são relativamente abundantes (Figura 1.2B) e mais de 80% dos seus transcritos identificados codificam enzimas trombina-símile. Outros transcritos de SVSP correspondem a ativadores de plasminogênio e serinoproteases caliceína-símile e quimotripsina-símile. Muitas serinoproteases têm sido relatadas em peçonhas de serpentes (especialmente na família Viperidae), incluindo as serinoproteases descritas acima e aquelas com atividade de agregação de plaquetas (CASTRO *et al.*, 2004; SANCHEZ *et al.*, 2006; SERRANO; MAROUN, 2005). Acerca do espécime de Cdt usado neste estudo, transcritos de gioxina correspondem a pelo menos 9% do proteoma da peçonha (Tabela 1.4).

**Lectinas do tipo-C (lectinas ligadoras de açúcar) e proteínas lectina do tipo-C-símile (CLPs).** As lectinas do tipo-C normalmente apresentam baixa toxicidade e sua principal função é a aglutinação de eritrócitos. Além disso, elas também podem contribuir para a ação antibacteriana durante a digestão da presa a partir do reconhecimento de carboidratos específicos de patógenos. Por sua vez, as CLPs perderam a atividade de reconhecimento de carboidratos devido à perda de um sítio de ligação ao cálcio, estando geralmente relacionadas a efeitos anticoagulantes, ativação de plaquetas e ação antitrombótica. Essas proteínas são amplamente revisadas na literatura (ARLINGHAUS; EBLE, 2012; CLEMETSON, 2010; DU; CLEMETSON, 2010; SARTIM; SAMPAIO, 2015).

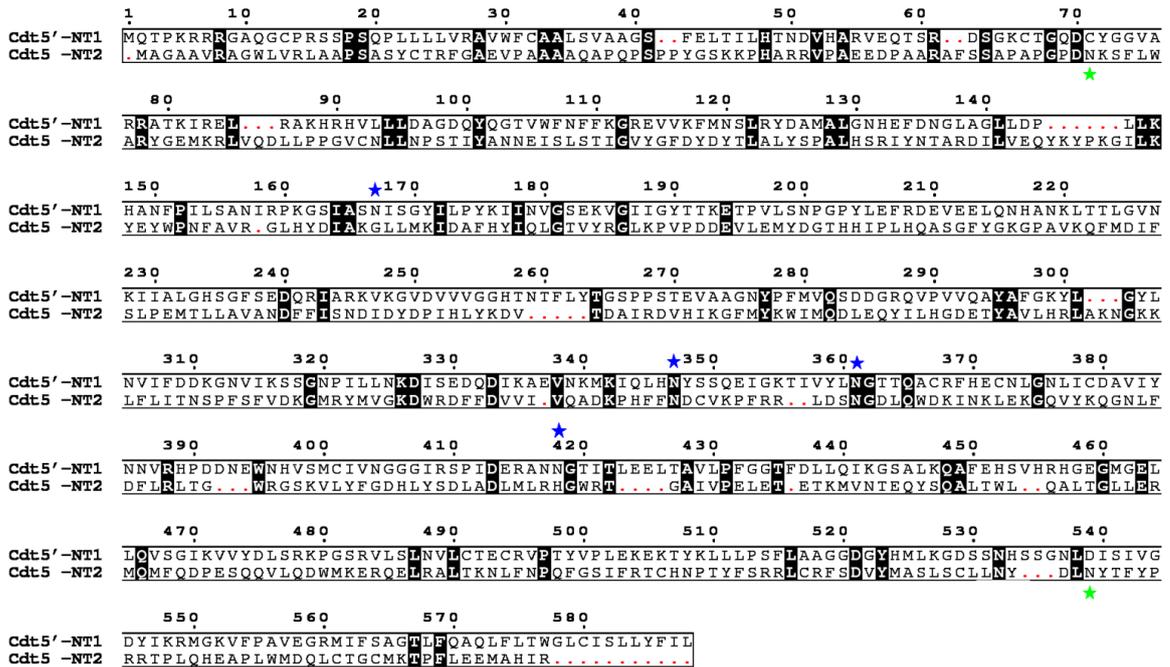
Aproximadamente 11% dos transcritos de componentes da peçonha (Figura 1.2A) correspondem a lectinas do tipo-C e CLPs, mas representam menos de 2% em abundância (Tabela 1.2). A maioria (22 sequências) codifica isoformas de CLPs: crotocetina (sp|Q719L8)

e subunidades alfa (sp|O93426) e beta (sp|O93427) da convulxina de *C. d. terrificus*. Além disso, novas isoformas de crotocetina (Snaclec crotocetin 2 and 3) foram identificadas (Tabela 1.3). Três transcritos foram identificados como galectinas, CdtGALEC1, CdtGALEC2 e CdtGALEC3 (Tabela 1.3), e outras lectinas do tipo-C (CdtCLEC1, CdtCLEC2 e CdtCLEC3) também foram detectadas (Tabela 1.3). Em contraste, apenas 2 peptídeos fragmentados foram identificados no proteoma da peçonha.

**Nucleases e nucleotidasas.** Essas proteínas constituem aproximadamente 8% dos transcritos de proteínas da peçonha (Figura 1.2A). Cdt5'-NT1 e Cdt5'-NT2 são 5'-NTs muito similares em tamanho e massa molecular (Tabela 1.3), porém compartilham apenas 26,8% de similaridade em sua sequência de aminoácidos e também divergem com relação ao número e localização de potenciais sítios de N-glicosilação (Figura 1.6A). Sobre as PDEs, CdtPDE1 e CdtPDE2 são 96,8% idênticas entre si, mas divergem em um intervalo na região 589-616 (Tabela 1.3, Figura 1.6B). Em contraste, CdtPDE3 é uma PDE de maior tamanho, apresentando 898 resíduos de aminoácidos (Tabela 1.3). Todas as três PDEs apresentam o mesmo padrão de domínios: uma região de hélice transmembrana no N-terminal, 2 domínios somatomedina B-símile, 1 domínio PDE e um domínio de endonuclease não específica de DNA/RNA (Figura 1.7). A abordagem proteômica mostrou que peptídeos corresponderam à mesma região das 3 PDE identificadas no transcriptoma, não permitindo a identificação das isoformas. Em contrapartida, com relação às 5'-NTs, apenas a Cdt5'-NT1 está presente nessa peçonha.

5'-NTs e PDEs estão usualmente presentes em peçonhas de serpentes, mas suas funções ainda não estão muito bem conhecidas (AIRD, 2002; DHANANJAYA; D SOUZA, 2010; MARGRES; *et al.*, 2014; SALAZAR-VALENZUELA *et al.*, 2014). As 5'-NTs e PDEs encontradas neste estudo contêm uma região transmembrana em sua estrutura primária. É conhecido que algumas proteínas transmembranas, incluindo dipeptidil peptidase IV (DPP IV), aminopeptidase A (APA) e ecto-5'-nucleotidase, são liberadas no lúmen da glândula de peçonha por exossomos durante o processo de secreção da peçonha (CARREGARI *et al.*, 2018; NICOLAU *et al.*, 2017; OGAWA *et al.*, 2008). De fato, microvesículas originadas da fragmentação ou brotamento de microvilosidades têm sido detectadas na peçonha de Cdt contendo ecto-5'-nucleotidase, aminopeptidase N (APN) e algumas proteínas celulares (CARNEIRO *et al.*, 2007; SOUZA-IMBERG *et al.*, 2017).

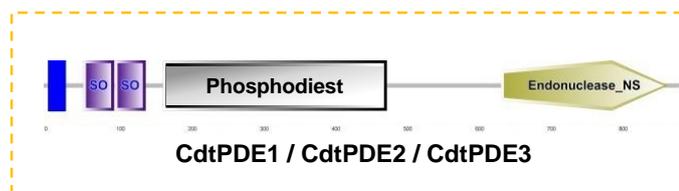
**A**



**B**



**Figura 1.6 – Alinhamento de seqüências entre nucleotídeos e PDEs. A)** Cdt5'-NT1 e Cdt5'-NT2. Estrelas acima da seqüência indicam potenciais sítios de N-glicosilação para Cdt5'-NT1 enquanto aquelas abaixo da seqüência indicam os mesmos sítios para Cdt5'-NT-2. **B)** CdtPDE1 e CdtPDE2. É mostrada apenas a região 561-621. Os alinhamentos foram gerados pela ferramenta *MultAlin* e editados pelo servidor *ESPrpt*. As regiões de alto consenso estão destacadas em caixas pretas.



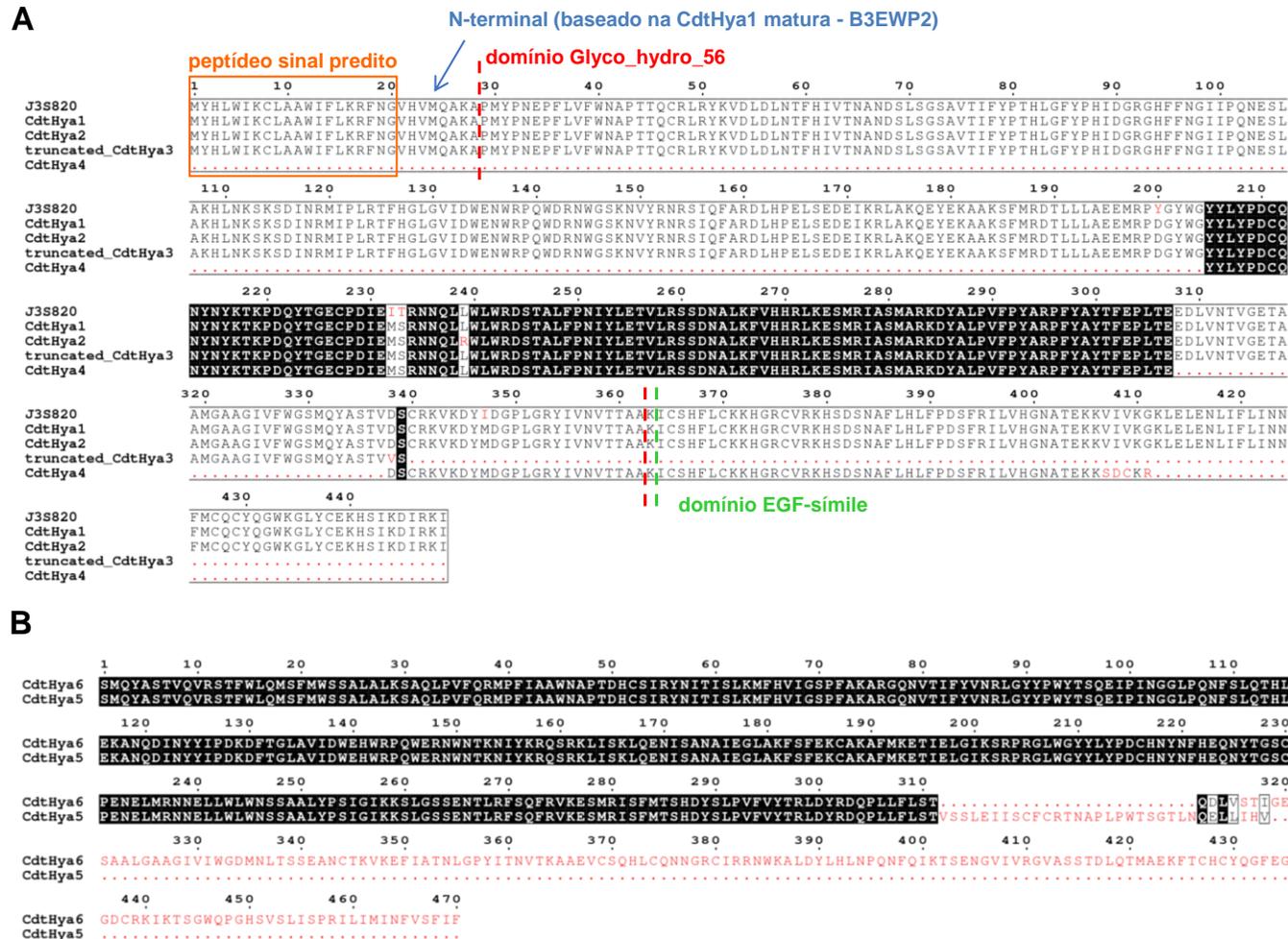
**Figura 1.7 – Domínios estruturais presentes nas PDEs.** Domínios: endonuclease\_NS: endonuclease; Phosphodiesterase: fosfodiesterase; SO: somatomedina B-símile. A caixa azul representa uma região de hélice transmembrana. As imagens dos domínios foram geradas pela ferramenta *SMART (Modular Architecture Research Tool)*.

**Hialuronidasas.** Transcritos de hialuronidasas não são abundantes (Figura 1.2B, Tabela 1.2), e representam apenas 2,3% do número de transcritos relacionados aos componentes da peçonha (Figura 1.2A). CdtHya1 e CdtHya2 codificam hialuronidasas similares à hialuronidase de *C. adamanteus* (sp|J3S820), composta por dois domínios principais: i) um Glyco\_hydro\_56 (família de hidrolase de glicosídeos, compreendendo apenas hialuronidasas - EC 3.2.1.35), e ii) um domínio EGF-símile (fator de crescimento epidermal-símile) (Figura 1.8A). A única

diferença entre elas está na posição 239, com a substituição Leu239Arg (Figura 1.8A). Também foi identificada uma sequência truncada (*truncated CdtHya3*), codificada até a Ser339, e uma sequência incompleta (CdtHya4) com a deleção de 31 resíduos de aminoácidos na região 308-338 (Figura 1.8A). Em contraste, CdtHya5 e CdtHya6 são 92% idênticas entre os resíduos alinhados em relação à hialuronidase-4 e hialuronidase-2 de *O. hannah* (gb|ETE67862.1 e ETE73352.1, respectivamente). Além disso, CdtHya6 apresenta um domínio Glyco\_hydro\_56 e um EGF-símile enquanto CdtHya5 apresenta apenas um único domínio Glyco\_hydro\_56. CdtHya5 e CdtHya6 são perfeitamente alinhadas entre os 311 primeiros resíduos de aminoácidos (Figura 1.8B).

Embora as hialuronidases sejam proteínas minoritárias em peçonhas de serpentes (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017; BORDON *et al.*, 2012, 2015; WIEZEL *et al.*, 2015), apresentam um papel-chave no processo de envenenamento por atuar como um fator de espalhamento (BORDON *et al.*, 2012). Como esperado, o TPM das hialuronidases foi bastante baixo, compreendendo, no máximo, 0,3% dos componentes da peçonha, e os peptídeos foram identificados nas proteínas CdtHya1 e CdtHya2, não permitindo a diferenciação das isoformas expressas na glândula de peçonha. Todavia, a CdtHya1 já foi isolada anteriormente dessa peçonha (BORDON *et al.*, 2012). Melani e colaboradores (2015) encontraram 0,8% de hialuronidases na CdtV, mas outras abordagens proteômicas de peçonhas de *C. durissus* (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; CALVETE *et al.*, 2010) não haviam detectado essas enzimas.

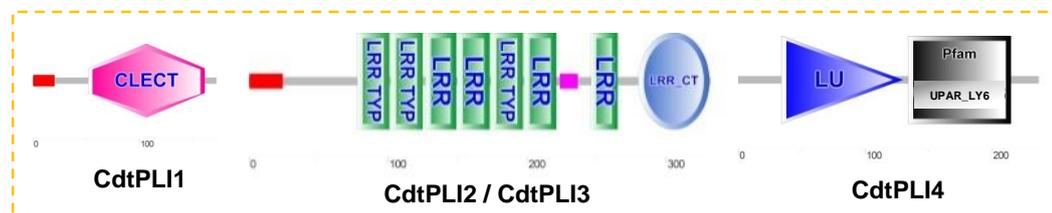
A enzima *truncated CdtHya3* é uma proteína truncada devido a um códon de terminação na posição 339, causando a perda de 23 resíduos de aminoácidos do domínio hidrolase e a perda completa do domínio *EGF-like*. Embora importantes resíduos para a atividade catalítica permanecem não afetados, a perda no domínio hidrolase causa a deficiência de 3 potenciais ligações dissulfeto, o que prejudicaria a estrutura tridimensional da hialuronidase. O transcrito que codifica essa hialuronidase truncada apresentou TPM comparável às outras isoformas de hialuronidase (resultados não mostrados). Portanto, supõe-se que essa enzima possa apresentar um papel intracelular (CHERR; YUDIN; OVERSTREET, 2001) ou mesmo auxiliar como uma “armadilha” para possíveis inibidores de hialuronidases existentes no tecido da presa/vítima (MIO; STERN, 2002).



**Figura 1.8 – Estrutura primária das hialuronidasas.** **A)** Alinhamento múltiplo de seqüências de CdtHya1, CdtHya2, CdtHya3 truncada (*truncated CdtHya3*), CdtHya4 e J3S820 (hialuronidase de *C. adamanteus*). O peptídeo sinal predito está indicado pela caixa laranja. Os domínios glyco\_hydro\_56 (posições 29 a 362) e EGF-símile (posições 364 a 449) estão separados, respectivamente, por tracejado vermelho e verde. **B)** Alinhamento de seqüências entre CdtHya5 e CdtHya6. Os alinhamentos foram gerados ferramenta *MultAlin* (A) e *Clustal Omega* (B) e editados pelos servidores *ESPrpt* e *BioEdit Sequence Alignment Editor*. Para ambos os alinhamentos, regiões de alto consenso estão destacadas em caixa preta e, as de baixo consenso, em vermelho.

A produção de peçonha pode ser influenciada pela dieta, ambiente, sexo e outros fatores que afetam a vida animal, e, uma vez que representa um alto custo metabólico para as células (MORGENSTERN; KING, 2013; ZELANIS *et al.*, 2010), o uso de “proteínas de armadilha” poderia ser uma forma de aumentar a efetividade da ação das “hialuronidases verdadeiras”. Recentemente, uma hialuronidase truncada foi detectada na glândula de peçonha de *Bothrops pauloensis* (CASTANHEIRA *et al.*, 2014). A identidade de 100% entre os primeiros 311 resíduos de CdtHya5 e CdtHya6 e o fato de o restante de suas sequências não serem devidamente alinhadas podem sugerir que CdtHya5 e CdtHya6 possam ser o resultado de uma mesma transcrição gênica que sofreu o processo de *splicing* alternativo, dando origem a duas diferentes isoformas (CASTANHEIRA *et al.*, 2014).

**Inibidores de PLA<sub>2</sub>.** Transcritos de PLI compreendem 1,7% dos transcritos relacionados a componentes da peçonha (Figura 1.2A) e menos de 0,5% no proteoma (Tabela 1.2). O CdtPLI1 tem um domínio de reconhecimento de carboidrato, enquanto CdtPLI2 e CdtPLI3 são compostos de vários domínios ricos em leucina (Figura 1.9). Em contraste CdtPLI4 é uma proteína que contém o domínio antígeno Ly-6/receptor de plasminogênio ativador de uroquinase (receptor uPA)-símile (Figura 1.9).



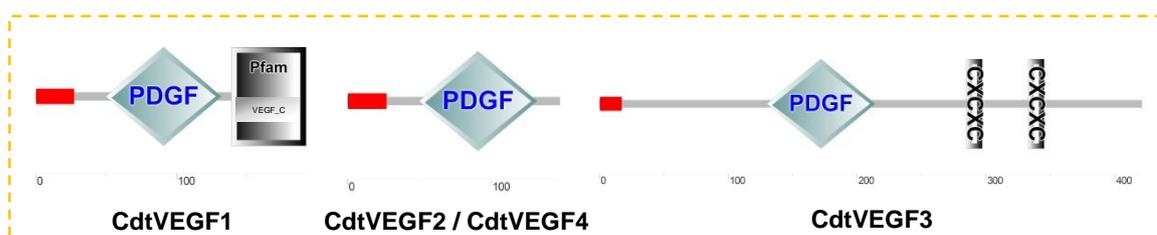
**Figura 1.9 – Domínios estruturais dos inibidores de PLA<sub>2</sub>.** Domínios: CLECT: lectina do tipo-C; LRR: repetição rica em leucina; LRR\_CT: domínio C-terminal de repetição rica em leucina; LRR TYP: subfamília típica de repetições ricas em leucina; LU e UPAR\_LY6: domínio do antígeno Ly-6/receptor de plasminogênio ativador de uroquinase-símile; A caixa rosa representa uma região de baixa complexidade. O peptídeo sinal está representado por uma caixa vermelha. As imagens dos domínios foram geradas pela ferramenta SMART (*Modular Architecture Research Tool*).

Os PLIs têm sido principalmente estudados a partir do plasma/soro de serpentes e acredita-se que a função dessas proteínas seja parte de um mecanismo protetivo das serpentes (DUNN; BROADY, 2001; GIMENES *et al.*, 2014; SOARES *et al.*, 2003). No entanto, alguns autores também têm identificado PLIs em transcriptomas e proteomas de animais peçonhentos (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009; GAO *et al.*, 2013; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2006; PLA *et al.*, 2018).

No total, 3 classes de PLI foram identificadas no transcriptoma e a presença de diferentes motivos estruturais nesses inibidores provavelmente resulta em especificidades diferentes para diferentes grupos de PLA<sub>2</sub> (DUNN; BROADY, 2001). É interessante notar que peptídeos únicos identificados no proteoma corresponderam a um PLI de *C. adamanteus* (J3S0I2), detectado pela busca do BlastX mas que foi, provavelmente, excluído no filtro de qualidade da etapa de anotação dos transcritos.

Os PLIs são, geralmente, classificados como componentes não tóxicos e alguns autores sugerem que sua presença na peçonha possa ser resultado de contaminação durante o momento da extração (DUNN; BROADY, 2001; GIMENES *et al.*, 2014; MELANI *et al.*, 2015; SOARES *et al.*, 2003). Entretanto, a identificação desses inibidores em transcriptomas de glândulas de peçonhas (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2009; CIDADE *et al.*, 2006; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2006), incluindo este estudo, e a sua presença real na peçonha sugerem que PLIs podem exercer um papel no envenenamento e/ou proteção da glândula de peçonha.

**Fatores de crescimento.** Foram identificadas 4 diferentes famílias de fatores de crescimento no transcriptoma de *C. d. terrificus*. Um único transcrito de fator de crescimento neural (NGF) representa 0,3% das sequências relacionadas à peçonha enquanto fatores de crescimento do endotélio vascular somam 2,3% (Figura 1.2A). Os VEGFs também estão entre os transcritos mais abundantes (Figura 1.2, Tabela 1.2). A ORF do CdtVEGF1 codifica um VEGF com dois domínios: um fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF) e um domínio VEGF de ligação à heparina (Figura 1.10).



**Figura 1.10 – Domínios estruturais dos VEGFs.** Domínios: CXCXC: repetição CXCXCt; PDGF: família dos fatores de crescimento derivado de plaquetas e do endotélio vascular; VEGF\_C: domínio do VEGF de ligação à heparina. O peptídeo sinal está representado por uma caixa vermelha. As imagens dos domínios foram geradas pela ferramenta SMART (*Modular Architecture Research Tool*).

O CdtVEGF2 tem uma substituição Arg186Lys e uma deleção na região 142-185, que leva à perda do domínio de ligação à heparina (Figura 1.10). Por sua vez, o CdtVEGF4 apresenta os mesmos domínios que CdtVEGF2 (Figura 1.10) e compartilha identidade de 29,5% e 35% e similaridade de 43% e 51,9% com CdtVEGF1 e CdtVEGF2, respectivamente.

Além disso, o CdtVEGF3 contém dois domínios CXCXC na região C-terminal (Figura 1.10), cujo C representa um resíduo de Cys e X é qualquer resíduo de aminoácido.

A abundância dos fatores de crescimento é geralmente baixa em peçonhas de serpentes (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017). A respeito do NGF, foi detectado apenas um pequeno transcrito (288 pb) sem sua região madura, atrapalhando a identificação do NGF na peçonha usando o banco de dados do transcriptoma. Esse fragmento de transcrito é similar ao peptídeo sinal do NGF de *Ovophis okinavensis* (BAN82142) e *P. flavoviridis* (BAP39981), mas essa região não está presente no NGF de *C. d. terrificus* já depositado em bancos de dados (Q9DEZ9). No proteoma da peçonha, 10 peptídeos (únicos) coincidindo com o NGF Q9DEZ9 foram identificados, evidenciando sua presença na peçonha. No entanto, nenhum estudo a respeito de NGF de *C. d. terrificus* está disponível até o momento. Embora PTMs contribuam para a complexidade de NGF (EARL *et al.*, 2006), apenas peptídeos não modificados foram identificados.

Os fatores de crescimento de peçonhas de serpente também compreendem os VEGFs que pertencem à família VEGF-F (OTROCK; MAKAREM; SHAMSEDDINE, 2007). Eles geralmente são homodímeros entre 20-30 kDa (NAKAMURA *et al.*, 2014; TAKAHASHI *et al.*, 2004; YAMAZAKI *et al.*, 2009) que promovem angiogênese e aumento da permeabilidade vascular (CEBE-SUAREZ; ZEHNDER-FJALLMAN; BALLMER-HOFER, 2006; TAKAHASHI *et al.*, 2004). O transcrito de CdtVEGF3 mostrou alta massa molecular teórica, mas esses achados não excluem a possibilidade de ele ser posteriormente processado (JOUKOV *et al.*, 1996; YAMAZAKI *et al.*, 2009). A região C-terminal desse transcrito singular é característica de VEGF da classe C (JOUKOV *et al.*, 1996).

VEGF foi identificado apenas recentemente na peçonha de Cdt (MELANI *et al.*, 2015). No proteoma da peçonha, os peptídeos relativos a VEGF são correspondentes às famílias VEGF-F e VEGF-A (OTROCK; MAKAREM; SHAMSEDDINE, 2007), incluindo CdtVEGF2 e CdtVEGF4. O CdtVEGF4 é o mais abundante entre eles, correspondendo a ~3% dos componentes no proteoma. Esses resultados demonstram a grande complexidade dos VEGF presentes em peçonhas de serpentes.

**Componentes minoritários.** A proteína secretória rica em cisteína (CRISP) foi identificada como um único transcrito, com abundância de apenas 0,0002% no transcriptoma e, no máximo, 0,03% no proteoma (Tabela 1.2). Essa classe foi detectada no proteoma apenas

utilizando o banco de dados do transcriptoma. O transcrito CdtCRISP-1 contém os 16 resíduos de Cys conservados na família CRISP e o distinto Glu186, resíduo associado ao bloqueio da contração muscular (YAMAZAKI; HYODO; MORITA, 2003). No entanto, não apresenta a Phe189, que está relacionada aos fortes bloqueadores da contração do músculo liso (YAMAZAKI; HYODO; MORITA, 2003).

Componentes com abundância quase irrelevantes também incluem carboxipeptidase, aminopeptidase N (APN) e BPP/C-NP. Carboxipeptidase já foi anteriormente detectada em uma análise proteômica da peçonha de *C. d. collilineatus* (OLIVEIRA *et al.*, 2019) e, neste estudo, foi estimado até 0,1% de carboxipeptidase (CBP) no proteoma de CdtV. Duas sequências completas (além de alguns fragmentos) pertencem à família das CBP (Tabela 1.3). CdtCBP1 contém um peptídeo sinal para proteínas secretórias que não está presente em CdtCBP2. A respeito da APN, seu transcrito (CdtAPN1) é composto de 3 domínios: um domínio transmembrana, um domínio de metalopeptidase e um domínio composto por 16 hélices-alfa. É provável que a CdtAPN1 e a CdtCBP2 tenham sido liberadas para a peçonha através de vesículas como discutido acima para as 5'-NTs. No caso dos BPP/C-NP, 3 fragmentos de transcritos foram detectados apresentando 100% de identidade com o precursor da isoforma 2 de BPP-CNP (gi|15824636) de *C. d. terrificus*, mas os peptídeos identificados na peçonha não foram similares a eles. Portanto, apenas o banco de dados “Serpentes” foi efetivo na pesquisa para sua identificação no proteoma.

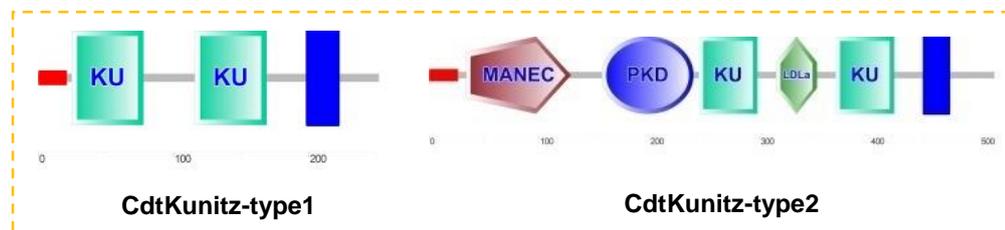
### 1.4.3 Componentes particulares à análise transcriptômica

Embora muitas proteínas tenham sido identificadas no proteoma da peçonha, alguns componentes foram detectados apenas no transcriptoma da glândula e são discutidos a seguir.

***Inibidores de cisteíno-proteases (CPI).*** Os CPI, cistatinas e glicoproteínas ricas em histidina (HRG), são quase 4% dos transcritos relacionados à peçonha (Figura 1.2A). A CdtCystatin1 é 99% idêntica à cystatin-1 de *Crotalus adamanteus* (sp|J3RYX9) e outras sequências de cistatinas são similares às aquelas identificadas nos transcriptomas de *P. mucrosquamatus* (XP\_015667611.1), *Python bivittatus* (XP\_007438766.2), *Thamnophis sirtalis* (XP\_013917518.1, XP\_013920405.1), *C. adamanteus* (sp|J3SE80) e *Ophiophagus hannah* (ETE69273.1, ETE66625.1).

Algumas peçonhas de serpentes têm demonstrado atividade de inibição de cisteíno-proteases (MASHIKO; TAKAHASHI, 2002). CdtCystatin1 não apresenta um peptídeo sinal em sua estrutura primária, o que poderia sugerir que sua presença na peçonha seria devido à secreção através de microvesículas, como já discutido acima para outras proteínas. Além disso, de acordo com o conteúdo de Cys, a CdtCystatin1 madura é provavelmente uma cistatina do tipo 2 assim como a cistatina da serpente *Bitis arietans* (RAWLINGS; BARRETT, 1990). Embora inibidores de CysProt pareçam ser comuns entre serpentes (KREGAR *et al.*, 1981; MASHIKO; TAKAHASHI, 2002; RICHARDS *et al.*, 2011), CdtCystatin1 é apenas a segunda cistatina reportada para uma serpente brasileira (CAMPOS *et al.*, 2016).

**Inibidores de serinoproteases.** Esses inibidores pertencem a 3 classes: tipo Kunitz, tipo Kazal e serpina-símile. Os inibidores do tipo Kunitz incluem as sequências completas CdtKunitz-type1 e CdtKunitz-type2 (Tabela 1.3). A ORF do CdtKunitz-type1 compreende o peptídeo sinal, 2 domínios consecutivos do tipo Kunitz e uma região de hélice transmembrana (Tabela 1.3 e Figura 1.11). Em contrapartida, a ORF do CdtKunitz-type2 contém os seguintes domínios: peptídeo sinal, MANEC, PKD, 2 domínios do tipo Kunitz, uma repetição rica em cisteína como no receptor de mamíferos de lipoproteína de baixa densidade, e uma região de hélice transmembrana (Figura 1.11).



**Figura 1.11 – Domínios estruturais dos inibidores do tipo Kunitz.** Domínios: KU: inibidores de serinoproteases da família BPTI/Kunitz; LDLa: domínio classe A do receptor de lipoproteínas de baixa densidade; MANEC: motivo N-terminal com 7 cisteínas. A caixa azul representa uma região de hélice transmembrana e o peptídeo sinal está representado por uma caixa vermelha. As imagens dos domínios foram geradas pela ferramenta SMART (*Modular Architecture Research Tool*).

Os inibidores do tipo Kunitz são geralmente compostos por ~60 aminoácidos e suas sequências de cDNA apresentam usualmente apenas uma cópia do domínio tipo Kunitz (CHENG; YAN; CHANG, 2005; INAGAKI *et al.*, 2012; REEKS; FRY; ALEWOOD, 2015). No CdtKunitz-type2, o domínio MANEC tem sido envolvido na formação de complexos de proteínas com ativadores de protease ou inibidores (GUO *et al.*, 2004), e o domínio PKD está geralmente presente em proteínas envolvidas em interações com outras proteínas (BYCROFT *et al.*, 1999).

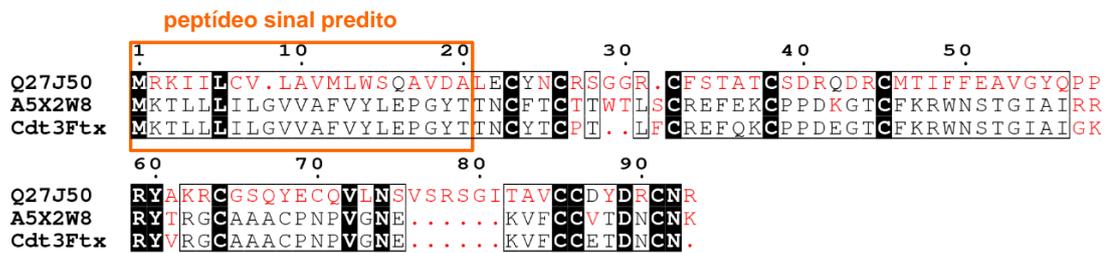
O inibidor do tipo Kazal (Tabela 1.3) é um fragmento único de cDNA. Além disso, inibidores serpina-símile foram identificados como fragmentos de cDNA similares a serpina (XP\_013916315) e neuroserpina (XP\_015677649). A classe do tipo Kazal foi isolada apenas de serpentes do gênero *Bothriechis* (FERNÁNDEZ *et al.*, 2016), sendo a primeira identificação de inibidor do tipo Kazal em glândula de peçonha de serpentes *Crotalus durissus*.

***L-aminoácido oxidase (LAAO)***. Foi identificado no transcriptoma um transcrito único de LAAO que codifica a sequência da bordonein-L contendo 516 resíduos de aminoácidos. Essa enzima é a primeira e recentemente isolada LAAO de CdtV (BORDON *et al.*, 2015). Também recentemente, a bordonein-L teve sua estrutura primária deduzida através de MS/MS (WIEZEL, 2016; WIEZEL *et al.*, 2019), sendo confirmada através deste estudo de transcriptoma. Diferentemente da crotamina, em que espécies crotamino-negativas não apresentam o gene da crotamina (RÁDIS-BAPTISTA *et al.*, 2004), serpentes Cdt produtoras de peçonha branca apresentam o gene que codifica a LAAO e já foi demonstrado que esse tipo peçonha apresenta atividade LAAO embora em baixa quantidade (WIEZEL, 2016). Sendo assim, a abundância extremamente baixa desse transcrito poderia atrapalhar a identificação de seu produto por MS/MS e, conseqüentemente, sua identificação no proteoma.

***Aminopeptidase A (APA)***. A sequência de CdtAPA apresenta os mesmos domínios já apresentados para a APN: um domínio transmembrana, um domínio de metalopeptidase e um domínio por 16 hélices-alfa. Devido à ausência de um peptídeo sinal, essa enzima possivelmente apresenta uma diferente via de secreção para o lúmen da glândula, por exemplo, através da secreção de microvesículas como já discutido, uma vez que APA já foi isolada com sucesso (VAIYAPURI *et al.*, 2010) e detectada em outros proteomas de peçonhas (AIRD *et al.*, 2013; GAO *et al.*, 2013).

***Vesprina***. O transcrito único de vesprina (CdtVespryn) codifica 218 resíduos de aminoácidos e pode-se inferir que apresenta as seguintes regiões: peptídeo sinal, propeptídeo, a cadeia da proteína madura e um segundo propeptídeo na região C-terminal. CdtVespryn tem 78% de similaridade quando comparado à ohanina de *O. hannah* (sp|P83234), que é a primeira e única vesprina isolada e caracterizada até o momento. Essa proteína tem sido associada a hipolocomoção e hiperalgesia em camundongos (PUNG *et al.*, 2005, 2006)

**Toxina three-finger (3FTx).** 3FTxs são proteínas não enzimáticas características de peçonhas de serpentes da família Elapidae e agem, especialmente, como neurotoxinas, cardiotoxinas, inibidores de acetilcolinesterase e bloqueadores de canais para cálcio do tipo-L (KINI; DOLEY, 2010). Neste trabalho, é apresentada a primeira evidência de transcritos de 3FTxs na glândula de peçonha de uma serpente *Crotalus*. A Cdt3FTx é 7 resíduos de aminoácidos menor que a 3FTx-símile de *Lachesis muta* (Figura 1.12) e ambas as sequências também divergem no conteúdo de cisteínas.



**Figura 1.12 – Alinhamento de sequência entre as 3FTx Q27J50, A5X2W8 e Cdt3Ftx.** O alinhamento foi gerado pela ferramenta MultAlin e editado pelo servidor ESPript. Regiões de alto consenso estão destacadas em caixa preta e, as de baixo consenso, em vermelho. Q27J50: 3FTx-símile de *Lachesis muta*; A5X2W8: 3FTx 3 de *Sistrurus catenatus*.

**Peptídeos antimicrobianos.** Viperidina e waprina-símile são peptídeos possivelmente envolvidos em ação antimicrobiana (DE OLIVEIRA; CARDOSO; FRANCO, 2013; FALCAO *et al.*, 2014; NAIR *et al.*, 2007). De fato, a crotalicidina sintética mostrou atividade contra diferentes espécies (Gram-positivas e negativas) de bactérias, células tumorais (HeLa e de leucemia) e *Trypanosoma cruzi* (BANDEIRA *et al.*, 2017; FALCAO *et al.*, 2014; 2015). O papel exato de peptídeos antimicrobianos em peçonhas de serpentes ainda não está claro, mas algumas das hipóteses incluem a inibição do crescimento de bactérias e proteção da serpente de patógenos da presa após sua ingestão (NAIR *et al.*, 2007).

**Acetilcolinesterase (AChE).** O cDNA da acetilcolinesterase é uma sequência completa, sem um peptídeo sinal para secreção na glândula, codificadora de uma proteína com 609 resíduos de aminoácidos (Tabela 1.3) similar às AChEs identificadas em diferentes serpentes, por exemplo, *Echis coloratus* (gb|AHY20009), *P. mucrosquamatus* (NCBI|XP\_015668657) e *Bungarus fasciatus* (sp|Q92035). AChEs são comuns em peçonhas da família Elapidae, geralmente não pertencendo às famílias Crotalidae e Viperidae, e contribuem para um efeito hipotensivo dessas peçonhas (AIRD, 2002; FROBERT *et al.*, 1997).

**Fator de crescimento de fibroblastos (FGF).** Uma das novidades na família dos fatores de crescimento é a identificação de FGF. Sequências de cDNA de FGF (2,6%) incluem uma sequência completa (CdtFGF, Tabela 1.3) altamente similar (>90%) ao FGF16 predito de *P. mucrosquamatus* (XP\_015671701). Adicionalmente, fragmentos de cDNA com identidade entre 28-43% ao CdtFGF mostram a presença de diferentes isoformas de FGF dentro da glândula de peçonha de *C. d. terrificus*. Recentemente, um FGF foi parcialmente isolado da peçonha de Cdt (FERREIRA, 2017).

**Outros componentes.** Transcritos codificantes de dipeptidilpeptidase (DPP) incluem uma sequência completa (CdtDPPII) e um fragmento (CdtDPPIV) similares à DPP II e DPP IV, respectivamente (Tabela 1.3). A dipeptidil peptidase (DPP) IV é uma serinoprotease provavelmente envolvida em alterações cardiovasculares induzidas pela peçonha agindo através da clivagem de alguns dipeptídeos de região N-terminal (AIRD, 2002, 2008; OGAWA *et al.*, 2008). Embora algumas peçonhas de serpentes já demonstraram atividade DPP IV (AIRD, 2002, 2008), nenhuma delas foi isolada até o momento.

Interessantemente, também foram identificados transcritos codificadores de *venom factor* (VF, Figura 1A), representando 2,3%, que são intimamente semelhantes ao VF de *C. adamanteus* (sp|J3S836). Com relação ao VF de *Crotalus*, nenhum estudo a respeito dessa proteína foi publicado até o momento e nenhuma sequência de VF de serpentes brasileiras está disponível nos bancos de dados. A atividade de VF tem sido principalmente descrita em peçonhas da família Elapidae (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2017). Alguns autores sugerem que o VF de *C. adamanteus* pode não apresentar uma função tóxica e ter se originado a partir de genes ortólogos de ancestrais que codificam VFs tóxicos (ROKYTA *et al.*, 2012).

Concluindo este item, 7 fragmentos de cDNA (2%; Figura 1.2A) são similares a uma provável lipase endotelial de *C. adamanteus* (sp|J3RZ81). Casewell e colaboradores (2009) relataram pela primeira vez transcritos de lipase ácida lisossomal em animais venenosos. Tais transcritos continham um peptídeo sinal predito, implicando que tais proteínas fossem um novo grupo de componentes da peçonha e sugerindo que possam apresentar algum papel no envenenamento. Adicionalmente, uma provável lipase endotelial secretada foi detectada no transcriptoma da glândula de peçonha de *C. adamanteus* (ROKYTA *et al.*, 2012) e uma lipase de *Phalotris mertensi* mostrou ser um verdadeiro componente de peçonha (CAMPOS *et al.*, 2016).

**Possíveis componentes de peçonha.** Além do discutido logo acima, outros componentes permanecem apenas como possíveis componentes de peçonha. São eles: CysProt, PLD, PDGF, MPi, HRG e MPPE. Com relação à CysProt, o transcrito CdtCysProt1 é similar a uma CysProt predita de *Protobothrops mucrosquamatus* (gi|1002569411) e essa classe de enzimas detectada apenas no transcriptoma da glândula de peçonha de *Lachesis muta* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2006). Acredita-se que cisteíno-proteases estejam evolutivamente relacionados às serinoproteases (RAWLINGS; BARRETT, 1993).

Com relação ao grupo de fosfolipases, foram identificados adicionalmente 3 fragmentos de transcritos de fosfolipase D (PLD) (Tabela 1.3), porém com valor de TPM muito baixo (Tabela 1.2). PLDs são largamente conhecidas como componentes de peçonhas de aranhas, apresentando-se como toxinas inflamatórias e dermonecróticas (CHAIM *et al.*, 2011; TAMBOURGI *et al.*, 1998). Embora análises de genoma e transcriptoma de *O. hannah* (VONK *et al.*, 2013) e *C. adamanteus* (ROKYTA *et al.*, 2012), respectivamente, mostram evidências dessa proteína, é a primeira vez que PLD é identificada em glândula de peçonha de uma serpente sul-americana. As sequências encontradas neste trabalho apresentam, em geral, 40-50% de identidade com fosfolipases de aranhas.

Com relação ao PDGF, os transcritos identificados são fragmentos que compreendem 0,9% dos transcritos de componentes da peçonha (Figura 1.2A) e são similares ao PDGF de *T. sirtalis* (XP\_013912203), *P. mucrosquamatus* (XP\_015674824), *P. bivittatus* (XP\_007432415) e *O. hannah* (gb|ETE64578). O PDGF pode ser tanto um domínio de VEGF como uma proteína única. Os fragmentos de cDNA de PDGF obtidos aqui são apenas até 30% idênticos a VEGF e acima de 90% quando comparados a PDGF ofídicos. Portanto, o PDGF identificado é, possivelmente, um componente da peçonha de Cdt.

**Inibidores de metaloproteases (MPi).** Os inibidores CdtMPi1 e CdtMPi2 diferem em sua sequência de nucleotídeos, mas codificam a mesma proteína madura (Tabela 1.3). Por sua vez, o CdtMPi3 compartilha 44,9% de identidade e 67,9% de similaridade com CdtMPi1/CdtMPi2 quando considerada apenas a cadeia da proteína madura codificada por eles. Esses inibidores correspondem a 0,9% dos transcritos de proteínas da peçonha e apresentam o domínio TIMP em sua estrutura, responsável pela inativação irreversível de metaloproteases teciduais (LETUNIC; DOERKS; BORK, 2015). A presença de diferentes MPis na mesma glândula pode indicar diferentes especificidades ou diferentes mecanismos de inibição.

Também tem sido proposto que inibidores enzimáticos têm papel de funções regulatórias ou de manutenção, mas também é sugerido que essas proteínas possam inibir proteases da presa/vítima, evitando a clivagem de toxinas ofídicas por elas (MASHIKO; TAKAHASHI, 2002; RICHARDS *et al.*, 2011).

HRG é um membro da superfamília das cistatinas, mas parece não ter atividade inibitória de CysProt (BROWN; DZIEGIELEWSKA, 1997). Nenhum estudo está disponível a respeito de HRG ofídica, mas HRG de mamíferos desempenham ações anticoagulantes e modificadoras antifibrinolíticas em camundongos (TSUCHIDA-STRAETEN *et al.*, 2005), o que leva a sugerir que, caso essas proteínas sejam verdadeiros constituintes da peçonha, elas podem exercer um papel na hemostasia em conjunto com SVMP e SVSP. Fragmentos de cDNA de HRG são similares à HRG de *O. hannah* (gb|ETE63529.1), cuja sequência foi identificada através de análise genômica.

Finalizando, angiogenina e MPPEs são relatadas pela primeira vez em um transcriptoma de glândula de peçonha de serpente. Três fragmentos codificadores de metalofosfoesterases (MPPEs, Tabela 1.3) representam <1,0% e três fragmentos de cDNA pertencentes à família de RNase angiogenina tiveram sua similaridade mais alta à angiogenina-2 de *O. hannah* (gb|ETE58890). A presença e o possível papel dessas proteínas nas peçonhas ainda precisa ser melhor investigada.

Considerando a relevância das PLA<sub>2</sub> nos envenenamentos e a identificação de inibidores de PLA<sub>2</sub> no transcriptoma realizado, optamos pela produção em sistema heterólogo de um desses inibidores, visando a produção e caracterização de uma molécula com potencial para se tornar um coadjuvante no tratamento de envenenamentos por serpentes.

## CAPÍTULO II

**Expressão heteróloga e caracterização bioquímica e funcional da  
versão recombinante do  $\beta$ -PLI CdtPLI2 da glândula de peçonha  
de *C. d. terrificus***

**2.1 INTRODUÇÃO**

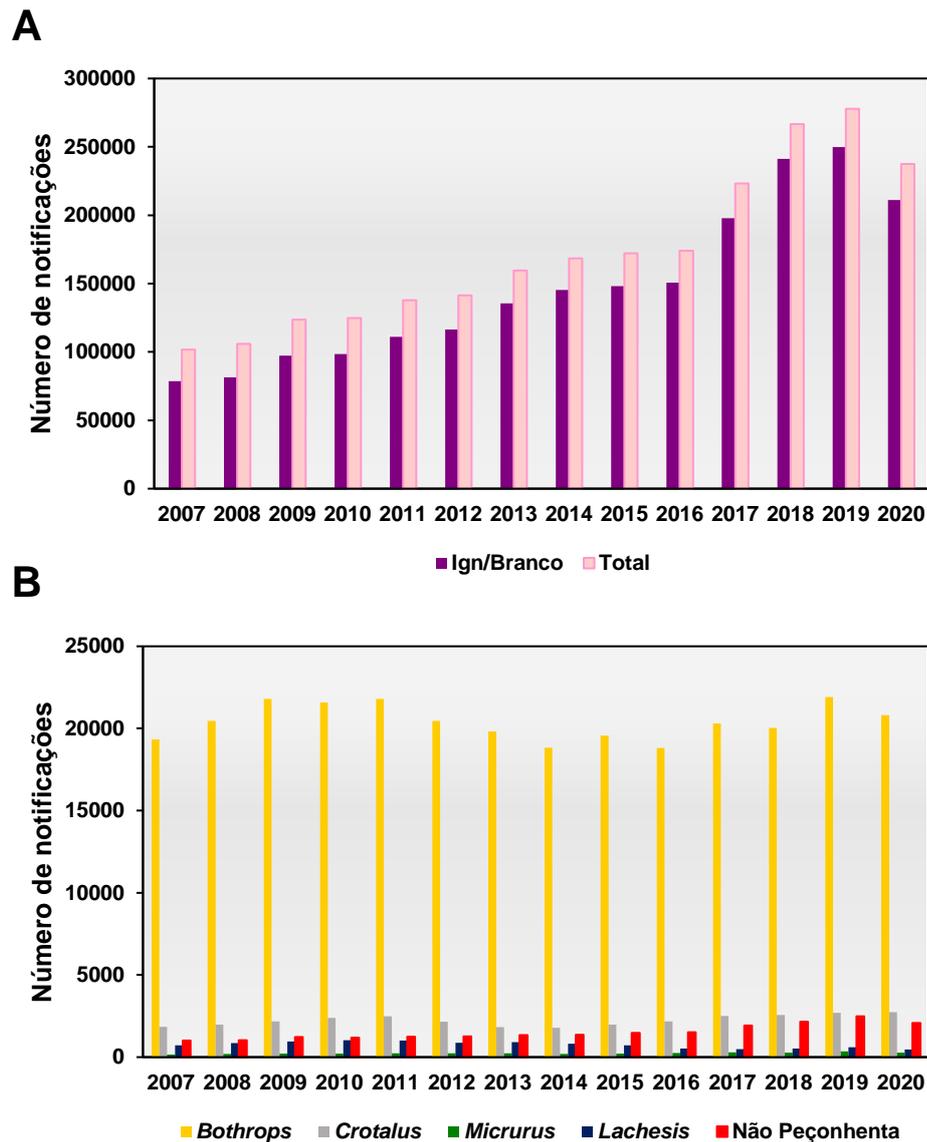
---

### 2.1.1 Panorama geral dos acidentes ofídicos

Os acidentes ofídicos são um problema negligenciado de saúde pública (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014). O reconhecimento pela Organização Mundial de Saúde como uma doença tropical negligenciada é devido tanto à gravidade desses acidentes quanto à sua incidência (CHIPPAUX, 2017). Estima-se que a cada ano mais de 5 milhões de pessoas sejam picadas por serpente em todo o mundo, dos quais 125 mil casos evoluem para a morte e 400 mil pessoas fiquem com sequelas permanentes (GUTIÉRREZ *et al.*, 2014).

No Brasil, uma análise detalhada do período de 2007 a 2020 (com dados de 2018 a 2020 ainda sob revisão) revela que o número total de casos de envenenamento por picada de serpentes vem aumentando ano após ano, saltando de 101.724 casos em 2007 para 237.534 em 2020 (BRASIL, 2021) (Figura 2.1A). Outro aumento também é verificado no número de casos em que o gênero da serpente não é identificado ou simplesmente ignorado no preenchimento da notificação (Figura 2.1A), o que pode dificultar o tratamento da pessoa envenenada, pois os soros antivenenos são específicos para determinado(s) gênero(s) de serpente (INSTITUTO BUTANTAN, 2018; HUI WEN *et al.*, 2015).

O gênero *Bothrops*, que representa a família das jararacas, apresenta disparadamente o maior número de casos registrados (Figura 2.1B). Entretanto, os gêneros *Crotalus* (família das cascavéis) e *Lachesis* (família das surucucus) apresentam os maiores índices de letalidade, sendo cerca de 2 vezes maior do que o índice das serpentes *Bothrops* (BRASIL, 2021). Isso se deve principalmente à diferença na composição das peçonhas visto que peçonhas botrópicas apresentam, geralmente, ação de destruição tecidual no local do envenenamento, enquanto peçonhas crotálicas e laquélicas têm maiores ações sistêmicas, incluindo neurotoxicidade e miotoxicidade (BRASIL, 2001a; ZORNETTA *et al.*, 2012).



**Figura 2.1 – Notificações de acidentes ofídicos A) totais e com gênero não identificado e B) por gênero de serpente entre os anos de 2007 e 2020.** Notificações de acidentes por animais peçonhentos registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação fornecidos pelo DATASUS – Ministério da Saúde (BRASIL, 2021). Dados entre 2018 e 2020 ainda estão sob revisão. Abreviação: Ign/Branco: casos em que o gênero da serpente foi ignorado ou não identificado no momento do preenchimento da notificação do acidente ofídico.

### 2.1.2 Fosfolipases A<sub>2</sub> e envenenamento

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são o componente majoritário das peçonhas crotálicas (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; CALVETE *et al.*, 2010; MELANI *et al.*, 2015). No envenenamento por serpentes, essas enzimas estão relacionadas, principalmente, com efeitos miotóxicos, neurotóxicos e hemolíticos, ações na agregação plaquetária e também formação de

edema devido à indução de processo inflamatório (BORDON *et al.*, 2012; CASAIS-E-SILVA *et al.*, 2016; PUNGERCAR; KRIZAJ, 2007; RODRIGUES *et al.*, 2007).

As PLA<sub>2</sub> encontradas na família Viperidae (que compreende os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) pertencem ao subgrupo IIA das PLA<sub>2</sub> secretadas, apresentando, em geral, massa molecular entre 13-15 kDa e 7 ligações dissulfeto, e podem ser cataliticamente ativas (Asp49-PLA<sub>2</sub>) ou inativas (Lys49-PLA<sub>2</sub>) (MORA-OBANDO *et al.*, 2014; SCHALOSKE; DENNIS, 2006). As PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativas são responsáveis por clivar a ligação sn-2 de fosfolipídeos de membranas (Figura 2.2), liberando ácidos graxos e lisofosfolipídeos (BURKE; DENNIS, 2009). Entre os ácidos graxos, destaca-se o ácido araquidônico, que é um precursor de eicosanoides mediadores de processos inflamatórios (DENNIS, 1997).

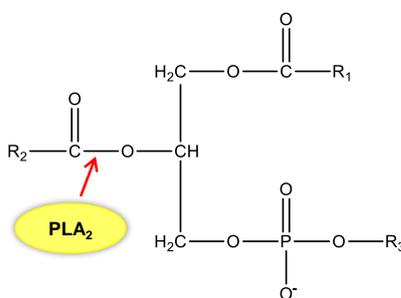


Figura 2.2 – Clivagem de fosfolipídeos de membranas por PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes.

A atividade catalítica é dependente dos resíduos His<sup>48</sup> e Asp<sup>99</sup>, que ativam uma molécula de água para iniciar o ataque nucleofílico no substrato, e do resíduo Asp<sup>49</sup>, que se liga ao cofator Ca<sup>2+</sup> e este estabiliza o intermediário tetraédrico formado durante a catálise (WARD; CHIOATO *et al.*, 2002). No entanto, algumas PLA<sub>2</sub> apresentam um resíduo de lisina na posição 49 cujo grupo amino da cadeia lateral ocupa a posição do cofator Ca<sup>2+</sup>, mas outros resíduos também parecem estar envolvidos na perda da atividade enzimática (por exemplo, a Lys<sup>122</sup>) visto que em um estudo de mutagênese sítio-dirigida realizada com a BthTX-I (uma PLA<sub>2</sub> botrópica), a substituição de Lys<sup>49</sup> por Asp<sup>49</sup> não ocasionou ganho de atividade enzimática (WARD *et al.*, 2002). Além da frequente substituição Asp<sup>49</sup>/Lys<sup>49</sup>, variantes com Ser, Arg, Asn ou Gln nessa mesma posição também já foram relatados (FERNANDES *et al.*, 2014).

As PLA<sub>2</sub>s encontradas na forma monomérica exercem papéis relevantes nos envenenamentos por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Lachesis* (DAMICO *et al.*, 2008; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989). Por sua vez, a crotoxina é o componente majoritário em peçonhas crotálicas, (FAURE *et al.*, 1994), chegando a representar até 90% da quantidade de proteínas totais na peçonha de *C. d. terrificus* (como visto no capítulo 1) e 82% na peçonha de

*C. d. ruruima* (CALVETE *et al.*, 2010). A crotoxina é uma proteína dimérica composta por duas subunidades (uma básica e outra ácida) ligadas não covalentemente.

A subunidade básica (CB ou PLA<sub>2</sub> de *Crotalus*), cataliticamente ativa, apresenta duas isoformas provenientes de dois diferentes RNA mensageiros, mas que diferem entre si em apenas 8 resíduos de aminoácidos dentre os 122 que compõem a proteína madura (BOUCHIER *et al.*, 1991; FAURE *et al.*, 1994). A CB é responsável por ações como indução de edema, miotoxicidade local e sistêmica e necrose do músculo esquelético (BORDON *et al.*, 2012; GUTIERREZ *et al.*, 2008; KOUYOUMDJIAN; HARRIS; JOHNSON, 1986).

Por sua vez, a subunidade ácida (CA ou crotapotina), cataliticamente inativa, é formada por 3 cadeias ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ), ligadas entre si através de ligações dissulfeto, provenientes do processamento pós-traducional de um único precursor (pró-CA) (BOUCHIER *et al.*, 1991; FAURE *et al.*, 1991). A interação CA-CB ocorre através de interações da CB com as cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  da CA, sendo críticas as interações dos resíduos Trp<sup>31</sup> e Trp<sup>70</sup> da CB com, respectivamente, Asp<sup>99</sup> e Asp<sup>89</sup> da cadeia  $\beta$ , que bloqueiam parcialmente o acesso do substrato à díade catalítica (His<sup>48</sup> e Asp<sup>99</sup>) e contribuem para a toxicidade e estabilidade do complexo. Dessa forma, a CA atua como uma chaperona, reduzindo a ação catalítica da CB e direcionando-a para sítios específicos que, quando afetados, levam principalmente a alterações neurotóxicas (BON *et al.*, 1979; CANZIANI; SEKI; VIDAL, 1983; HABERMANN; WALSCH; BREITHAUPT, 1972; RÜBSAMEN; BREITHAUPT; HABERMANN, 1971).

Diferentes isoformas de crotoxina têm sido identificadas, podendo ser divididas em dois grandes grupos: um altamente tóxico e menos enzimaticamente ativo e um segundo grupo menos tóxico, porém mais enzimaticamente ativo (FAURE; BON, 1987; FAURE *et al.*, 1991; 1994; FAURE; XU; SAUL, 2011). Essa diferença estaria relacionada com a estabilidade do complexo CA-CB: o grupo menos tóxico apresenta subunidades menos estáveis e que se dissociam mais rapidamente enquanto as isoformas mais tóxicas se dissociam mais lentamente (FAURE *et al.*, 1993; FAURE; XU; SAUL, 2011). Isso seria resultados de mutações no primeiro resíduo N-terminal (Ser/His) uma vez que a orientação da His<sup>1</sup> e do Trp<sup>70</sup> na CB estariam em orientação similar, preservando a interação com a CA e formando complexos mais estáveis do que em isoformas em que Ser<sup>1</sup> e Trp<sup>70</sup> estariam em orientações diferentes (FAURE; XU; SAUL, 2011).

Na década de 1960, Oswaldo Vital Brazil e colaboradores publicaram uma série de trabalhos sobre a crotoxina envolvendo sua toxicidade, atividade neuromuscular, ação

cardiovascular e nefrotoxicidade (SAMPAIO *et al.*, 2010). Nos casos de envenenamento crotálico que evoluem para o óbito, a crotóxina é o principal componente responsável pela letalidade devido ao bloqueio da transmissão neuromuscular, que leva a uma parada respiratória de origem periférica (BRAZIL, 1966; RODRIGUEZ *et al.*, 2006; SAMPAIO *et al.*, 2010). A crotóxina também pode ser responsável pela insuficiência renal aguda apresentada por vários sobreviventes do envenenamento crotálico e essa nefrotoxicidade pode ser causada em sinergismo com a crotamina (ALBUQUERQUE *et al.*, 2013; FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008; MONTEIRO *et al.*, 2001), um polipeptídeo com ação miotóxica (RÁDIS-BAPTISTA; KERKIS, 2011).

### **2.1.3 Tratamento dos acidentes ofídicos**

O tratamento dos acidentes ofídicos é realizado através da administração do soro antiofídico, produzido a partir da hiper-imunização de cavalos com a peçonha de interesse para posterior utilização do plasma/sangue para extrair e purificar as imunoglobulinas produzidas contra a peçonha administrada no cavalo. A seguir, o soro hiperimune é diluído e acrescentado de adjuvantes para, posteriormente, ser administrado na prática clínica (BRASIL, 1996; GUTIERREZ; LEON; BURNOUF, 2011).

Estão disponíveis no Brasil os seguintes soros antiofídicos: antibotrópico, antibotrópico-crotálico, antibotrópico-laquético, anticrotálico e antielapídico (INSTITUTO BUTANTAN, 2018; HUI WEN *et al.*, 2015). No tratamento do envenenamento por cascavéis, utiliza-se o soro anticrotálico ou antibotrópico-crotálico, podendo ser administradas até 20 ampolas de soro dependendo da gravidade do envenenamento (BRASIL, 2001b).

Embora o soro antiofídico seja utilizado por mais de um século desde sua introdução na clínica por Albert Calmette em 1895 (WARRELL, 2010) e apresente elevada eficácia (MORAIS; MASSALDI, 2009), sua utilização pode levar a reações adversas tanto precoces quanto tardias (LALLOO; THEAKSTON, 2003). Entre os efeitos precoces incluem reações de hipersensibilidade do tipo I, que se manifestam de forma branda na maioria dos casos (por exemplo, através de náuseas, diarreia, dor de cabeça, urticária e febre). Entretanto, dependendo da sensibilidade do paciente, pode ocorrer até mesmo um quadro de choque anafilático

(MORAIS; MASSALDI, 2009; WARRELL<sup>1</sup>, 1995 apud LEÓN *et al.*, 2008). Em um estudo de Bochner e Struchiner (2003), vítimas de envenenamento crotálico tratadas com o soro anticrotálico apresentaram um risco de desenvolvimento de anafilaxia 30 vezes maior do que outros pacientes internados na mesma unidade de emergência.

O efeito tardio da administração do soro é uma reação de hipersensibilidade do tipo III, ou seja, a produção de anticorpos humanos contra os anticorpos do cavalo que foram administrados na vítima do envenenamento. Essa reação, também conhecida como “doença do soro”, ocorre normalmente entre 7 a 15 dias após a administração do soro antiofídico (MORAIS; MASSALDI, 2009). Ainda é pouco conhecida a incidência dessa doença porque muitas vítimas não retornam ao serviço de saúde após a alta hospitalar (RYAN *et al.*, 2016). Vale ressaltar que essa reação também pode ocorrer em vítimas que já foram sensibilizadas com outros tipos de soro e pode estar altamente relacionada à quantidade de soro administrada na vítima (AMIN *et al.*, 2008; LOVECCHIO *et al.*, 2003; MORAIS; MASSALDI, 2009). A “doença do soro” é de grande relevância, pois os imunocomplexos formados podem se depositar em diferentes tecidos do organismo, levando, por exemplo, a quadros de insuficiência renal quando se depositam nos rins (DA SILVA *et al.*, 2011).

Atualmente, apesar de grandes esforços despendidos na produção dos soros antiofídicos, essa produção ainda é similar aos métodos originalmente descritos por Vital Brazil. Algumas inovações incluem o uso de apenas os fragmentos das imunoglobulinas do soro produzido no cavalo (F(ab')<sub>2</sub> ou Fab), o uso do fragmento da cadeia simples variável dos anticorpos (scFv) e o uso de domínios de ligação de antígeno recombinante derivados de anticorpos de cadeia pesada de camelídeos (VHH). No entanto, ainda existem grandes desafios nesse campo de estudo, como o alto custo da produção de anticorpos monoclonais, a baixa afinidade de alguns fragmentos de imunoglobulinas e a curta meia-vida dessas proteínas no soro (SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017).

Além disso, outros tratamentos do envenenamento que têm sido estudados nos últimos anos incluem a utilização de inibidores naturais das toxinas de serpentes. Alguns exemplos incluem a inibição de hialuronidases, que atuam como fator de espalhamento da peçonha (BORDON *et al.*, 2012; WAHBY *et al.*, 2012), de metaloproteases, que estão relacionadas a efeitos inflamatórios/hemorragicos (BALDO *et al.*, 2010; TEIXEIRA *et al.*, 2005; VALENTE

---

<sup>1</sup>WARRELL, D.A. Clinical toxicology of snakebite in Asia. In: Meier, J.; White, J. (Eds). **Handbook of Clinical Toxicology of Animal Venoms and Poisons**. Boca Raton: CRC Press, 1995. p. 493-594.

*et al.*, 2001), e de PLA<sub>2</sub> (BRYAN-QUIRÓS *et al.*, 2019; LIZANO *et al.*, 1997; ROCHA *et al.*, 2002; WANG *et al.*, 2018). Outras alternativas também incluem o desenvolvimento de nanopartículas com habilidade para se ligar a diferentes componentes de peçonha e aptâmeros e outras moléculas sintéticas que inativam toxinas particulares (GUTIÉRREZ, 2020).

Como descrito anteriormente, a crotoxina é o componente da peçonha responsável pela maior gravidade dos envenenamentos crotálicos e pela mortalidade observada nesses acidentes. Portanto, o uso de moléculas com alta especificidade para esse complexo de PLA<sub>2</sub> auxiliaria no desenvolvimento de antivenenos que fossem mais específicos para esse componente. Por esse motivo, inibidores de PLA<sub>2</sub> se apresentam como ótimos candidatos a serem utilizados como complemento na terapia do envenenamento na tentativa de diminuir a dose de soro administrada na vítima.

#### **2.1.4 Inibidores de PLA<sub>2</sub>**

Os inibidores de PLA<sub>2</sub> (PLIs) compreendem uma família de proteínas primeiramente descritas no sangue de serpentes que são capazes de neutralizar a ação de PLA<sub>2</sub>s (FORTES-DIAS, 2002). Acredita-se que essas proteínas façam parte de um mecanismo inato de defesa contra a própria peçonha (no caso de serpentes peçonhentas) ou contra a peçonha de outras serpentes visto que PLIs também já foram encontrados no sangue de serpentes não peçonhentas (DUNN; BROADY, 2001; FORTES-DIAS *et al.*, 1991; FORTES-DIAS *et al.*, 2020; KINKAWA *et al.*, 2010; OKUMURA *et al.*, 2002; RODRIGUES *et al.*, 2020). Além disso, sugere-se uma função ancestral de ligação ao citocromo c liberado de células mortas, antes mesmo de sua função como inibidor de PLA<sub>2</sub>, e um importante papel fisiológico no sistema de defesa do organismo (OKUMURA *et al.*, 2003; SHIRAI *et al.*, 2010).

Essas proteínas são classificadas de acordo com seus domínios estruturais e capacidade de inibição de diferentes PLA<sub>2</sub> em 3 diferentes classes: alfa ( $\alpha$ -PLI), beta ( $\beta$ -PLI) e gama ( $\gamma$ -PLI), sendo que diferentes classes podem ser identificadas em uma mesma serpente (CAMPOS *et al.*, 2016; ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2016; OHKURA *et al.*, 1997). A classificação dos PLIs segundo a atividade biológica exercida por esses inibidores não é uma tarefa fácil, uma vez que

a maioria dos estudos relacionados a essas proteínas os descrevem apenas como “inibidores de fosfolipases” (PERALES; DOMONT<sup>2</sup>, 2002 apud NEVES-FERREIRA *et al.*, 2010).

**$\alpha$ -PLIs.** Os  $\alpha$ -PLIs são compostos por pequenas subunidades (~20 kDa) que se combinam e formam estruturas multiméricas, geralmente trímeros, com massa molecular entre 75 e 120 kDa (CAMPOS *et al.*, 2016; OKUMURA *et al.*, 2003; SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017). Esses inibidores são proteínas com um domínio de reconhecimento de carboidrato semelhante a lectinas, mas cujo domínio perdeu a capacidade de ligação ao cálcio e a carboidratos e são estruturalmente semelhantes à proteína surfactante pulmonar e a lectinas animais (INOUE *et al.*, 1991; OHKURA *et al.*, 1993; OKUMURA *et al.*, 2003).

Muitos  $\alpha$ -PLIs têm sido isolados do sangue serpentes, como já revisado na literatura (CAMPOS *et al.*, 2016; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017). A inibição das PLA<sub>2</sub> parece ser independente da atividade de lectina embora ainda não se saiba o mecanismo exato envolvido nessa inibição (OHKURA *et al.*, 1993; SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017). Sugere-se que a trimerização de  $\alpha$ -PLIs é importante para a formação de um poro com resíduos catiônicos no centro que interagem com resíduos ácidos das PLA<sub>2</sub>s ácidas e a formação de poros atípicos devido à mutação de alguns resíduos de aminoácidos levam a uma funcionalidade prejudicada no inibidor (ESTEVÃO-COSTA *et al.*, 2016).

**$\beta$ -PLIs.** Os  $\beta$ -PLIs apresentam uma estrutura com vários domínios ricos em leucina semelhante à  $\alpha_2$ -glicoproteína humana e relata-se uma inibição preferencial por PLA<sub>2</sub>s básicas (OKUMURA *et al.*, 1998). Esses inibidores são normalmente glicosilados, apresentando massa molecular monomérica de ~50 kDa, que, após reação de deglicosilação, é reduzida para ~39 kDa (OKUMURA *et al.*, 1998; 2002). Além disso,  $\beta$ -PLIs podem assumir uma forma trimérica com, aproximadamente, 150 kDa (CAMPOS *et al.*, 2016; OKUMURA *et al.*, 1998). Poucos inibidores dessa classe foram relatados até o momento incluindo aqueles presentes em serpentes não peçonhentas (LIMA *et al.*, 2011; OHKURA *et al.*, 1997; OKUMURA *et al.*, 1998; 2002; SHIRAI *et al.*, 2009).

Suspeita-se que os domínios ricos em leucina sejam responsáveis pela interação com as PLA<sub>2</sub>s visto que esses domínios são bem conservados nesses inibidores e estão, usualmente,

---

<sup>2</sup>PERALES, J. DOMONT, G. B. Are inhibitors of metalloproteinases, phospholipases A<sub>2</sub> and myotoxins members of the innate immune system? In: Ménez, A (Ed). **Perspectives in molecular toxinology**. Chichester: John Wiley & Sons, 2002. p. 435-456.

envolvidos em interações do tipo proteína-proteína (OKUMURA *et al.*, 1998, 2002). Um estudo de *docking* e modelagem molecular sugeriu que o  $\beta$ -PLI Cdtsb $\beta$ PLI do sangue de *C. d. terrificus* apresenta um formato semelhante a uma ferradura cuja face côncava apresenta resíduos ácidos para interação com resíduos catiônicos das PLA<sub>2</sub> básicas (FORTES-DIAS *et al.*, 2019).

$\gamma$ -PLIs. Por sua vez, os  $\gamma$ -PLIs apresentam uma conformação “*three-fingered*”, similar às neurotoxinas elapídicas “*three-finger*”, aos antígenos Ly-6 de superfícies de células de mamíferos e ao receptor de ativador de plasminogênio do tipo uroquinase (NEVES-FERREIRA *et al.*, 2010; OHKURA *et al.*, 1997). Esses inibidores representam o maior grupo de PLIs endógenos isolados do sangue de serpentes (CAMPOS *et al.*, 2016), estando presentes nas famílias Colubridae, Elapidae, Pythonidae e Viperidae, e compreendem os únicos inibidores já isolados de serpentes do gênero *Crotalus* até o momento (FORTES-DIAS *et al.*, 1991; GIMENES *et al.*, 2014; PERALES *et al.*, 1995).

Os  $\gamma$ -PLIs, assim como os  $\alpha$ - e  $\beta$ -PLIs, são glicoproteínas oligoméricas de alta massa molecular, podendo apresentar subunidades idênticas ou diferentes (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2017) e são capazes de inibir PLA<sub>2</sub>s tanto ácidas como básicas (OHKURA *et al.*, 1994).

O CNF (fator neutralizador de *Crotalus*) e o CICS (inibidor de crotoxina do soro de *Crotalus*) isolados, respectivamente do plasma e do soro de *C. d. terrificus* possuem atividade anti-neurotóxica e foram estudados independentemente por dois grupos de pesquisa (FORTES-DIAS *et al.*, 1991; PERALES *et al.*, 1995). O efeito anti-neurotóxico de CICS contra a peçonha de *Crotalus* e a crotoxina foram demonstrados *in vivo* através de ensaios de letalidade. Além disso, CNF e CICS inibiram a atividade catalítica da crotoxina e de sua PLA<sub>2</sub> básica ao se ligar à subunidade básica e ocasionar a dissociação do complexo da crotoxina (FORTES-DIAS *et al.*, 1994; PERALES *et al.*, 1995).

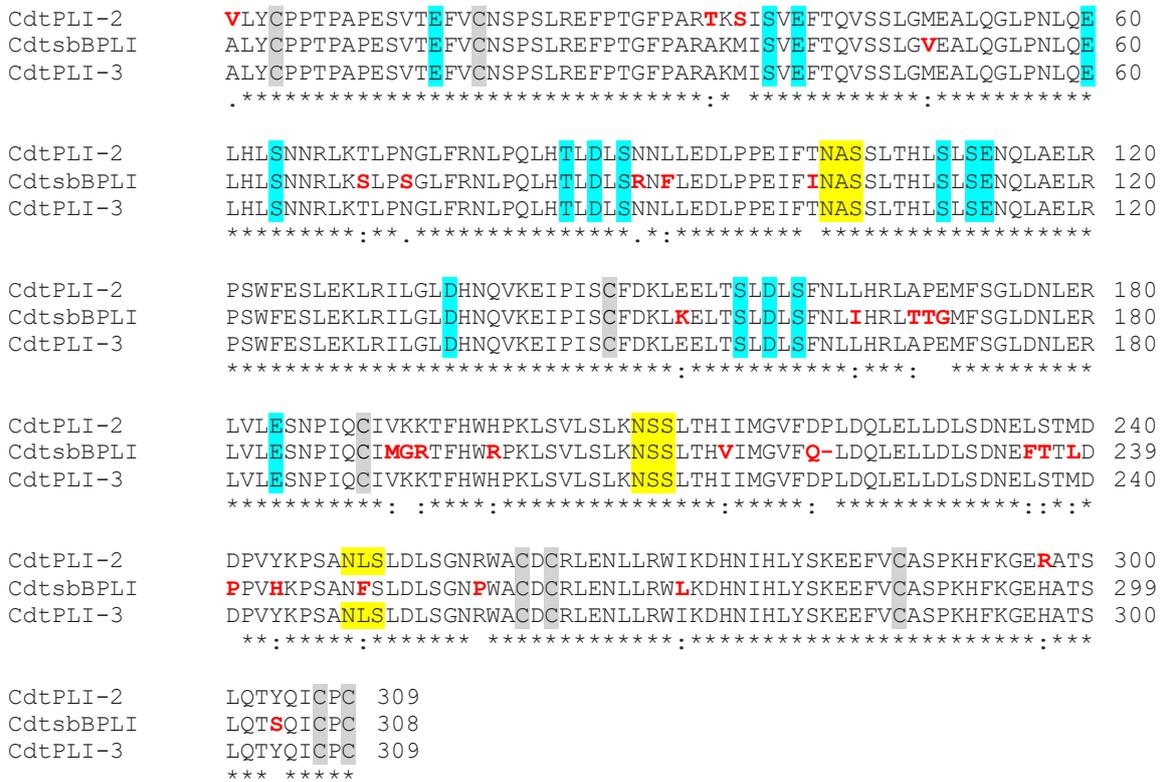
### 2.1.5 PLIs presentes em glândulas de peçonha

A presença de PLIs em glândulas de peçonhas ou peçonhas de serpentes não é muito comum. Peçonhas em que esses inibidores foram encontrados através de estudos de proteoma

incluem as peçonhas de *C. d. terrificus* (MELANI *et al.*, 2015), incluindo este estudo, *Bothrops jararaca* (NICOLAU *et al.*, 2017) e *Boiga irregularis* (PLA *et al.*, 2018).

Além disso, técnicas ômicas também permitiram a identificação de transcritos de PLIs em glândulas de peçonhas de serpentes. Como exemplos, podem ser citados inibidores nas glândulas de *Lachesis muta* (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2006; LIMA *et al.*, 2011), *B. jararaca* (CIDADE *et al.*, 2006; VALENTE *et al.*, 2018) e *B. irregularis* (PLA *et al.*, 2018) além deste trabalho como já discutido no capítulo 1.

Interessantemente, o inibidor CdtbβPLI recentemente identificado em amostra de DNA do fígado de *C. d. terrificus* (FORTES-DIAS *et al.*, 2019) apresenta sequência muito semelhante aos inibidores CdtPLI-2 e CdtPLI-3 encontrados na glândula de peçonha dessa mesma serpente (Figura 2.3).



**Figura 2.3 – Alinhamento múltiplo para comparação das sequências de aminoácidos dos inibidores CdtPLI-2, CdtPLI-3 e CdtbβPLI.** Resíduos não conservados estão destacados em vermelho. Os resíduos de cisteína conservados e os possíveis sítios de N-glicosilação estão, respectivamente, destacados em cinza e amarelo. Resíduos conservados envolvidos na interação com PLA<sub>2</sub>s (Fortes-Dias *et al.*, 2019) estão destacados em azul.

Uma vez que os inibidores de *C. d. terrificus* ainda não foram isolados de sua peçonha (MELANI *et al.*, 2015), e temos disponível as sequências codificadoras dessas proteínas, a expressão heteróloga de proteínas se apresenta como uma poderosa ferramenta para produção

do PLI recombinante, possibilitando a realização de estudos estruturais e funcionais desse inibidor.

### 2.1.6 Expressão heteróloga de proteínas

A expressão heteróloga de proteínas consiste em uma ferramenta de grande importância na Toxinologia uma vez que pode fornecer em um curto período grandes quantidades de toxinas, normalmente encontradas em concentrações extremamente baixas nas peçonhas animais, auxiliando potenciais aplicações farmacêuticas que essas toxinas possam apresentar. Os sistemas de expressão mais utilizados para a produção de proteínas recombinantes são a bactéria *Escherichia coli* e a levedura metilotrófica *Pichia pastoris* brevemente apresentados nos itens a seguir.

#### 2.1.6.1 *Escherichia coli*

A *E. coli* é o sistema heterólogo muitas vezes preferencial principalmente por ser de fácil cultivo, apresentar um ciclo de vida curto e também por ser de fácil manipulação genética (GOPAL; KUMAR, 2013). Além disso, as rápidas taxas de crescimento e de expressão proteica permitem a expressão de grandes quantidades de proteínas recombinantes em um curto período de tempo (ROSANO; CECCARELLI, 2014). Outras vantagens incluem: meios ricos e complexos usados em seu cultivo podem ser feitos a partir de componentes relativamente baratos e a transformação das células com DNA exógena é rápida, podendo ser realizada em menos de 5 min (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

No entanto, entre as desvantagens na expressão de proteínas recombinantes em organismos procariotos, está a dificuldade na realização de modificações pós-traducionais, como glicosilações e ligações dissulfeto (DALY; HEARN, 2005). Essa deficiência aliada à alta concentração de proteínas produzidas, pode favorecer a agregação das mesmas e a formação de corpos de inclusão, sendo necessárias etapas adicionais de desnaturação, solubilização e enovelamento artificial da proteína recombinante (DALY; HEARN, 2005; ROSANO; CECCARELLI, 2014).

### 2.1.6.2 *Pichia pastoris*

A *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica e, por se tratar de um organismo eucarioto, contém a maquinaria celular necessária para a realização de modificações pós-traducionais e o enovelamento das proteínas produzidas (AHMAD *et al.*, 2014).

Além disso, na expressão em *P. pastoris*, a proteína recombinante pode ser secretada para o meio de cultura através da utilização de um sinal de secreção ( $\alpha$ -factor) no vetor de expressão, facilitando sua etapa de purificação (AHMAD *et al.*, 2014; CEREGHINO; CREGG, 2000; DALY; HEARN, 2005; MACAULEY-PATRICK *et al.*, 2005). Entretanto, o tempo necessário para a expressão de proteínas no sistema de *P. pastoris* é normalmente maior do que em *E. coli* (MORTON; POTTER, 2000), o padrão de glicosilação não é necessariamente o mesmo da proteína nativa e a heterogeneidade de glicosilações pode levar a diferentes populações de glicoproteínas (AHMAD *et al.*, 2014; DALY; HEARN, 2005).

Sendo assim, considerando a necessidade de se buscar novas alternativas para o tratamento do envenenamento (WILLIAMS *et al.*, 2019) e que PLIs são potenciais inibidores da crotoxina (FORTES-DIAS *et al.*, 1994; PERALES *et al.*, 1995), o presente capítulo visa à produção em sistema heterólogo de um  $\beta$ -PLI presente na glândula de peçonha de *C. d. terrificus*, sua extensiva caracterização estrutural e o seu estudo como um possível complemento na terapia do envenenamento crotálico.

## **2.2 OBJETIVOS**

---

Os objetivos deste capítulo incluem a expressão heteróloga, caracterização e avaliação do uso da versão recombinante do inibidor de PLA<sub>2</sub> CdtPLI2 identificado na glândula de peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Para isso, serão realizados:

- ✓ Expressão da proteína de interesse em diferentes sistemas de expressão heteróloga e seu isolamento através de diferentes técnicas cromatográficas
- ✓ Caracterização estrutural da proteína recombinante, com ênfase em massa molecular e modificações pós-traducionais (glicosilação)
- ✓ Avaliação do reconhecimento da proteína heteróloga pelo soro antiofídico comercial
- ✓ Avaliação *in vitro* da inibição da atividade de fosfolipases ácidas e básicas e da atividade fosfolipásica de peçonhas de diferentes serpentes brasileiras de importância médica
- ✓ Avaliação preliminar *in vivo* da redução da atividade edematogênica da crotoxina e da PLA<sub>2</sub> de *C. d. collilineatus*

## **2.3 MATERIAIS E MÉTODOS**

A figura 2.4 resume as principais etapas realizadas para expressão heteróloga e caracterização bioquímica e funcional das versões recombinantes do inibidor CdtPLI-2 identificado na glândula de peçonha de *C. d. terrificus*.

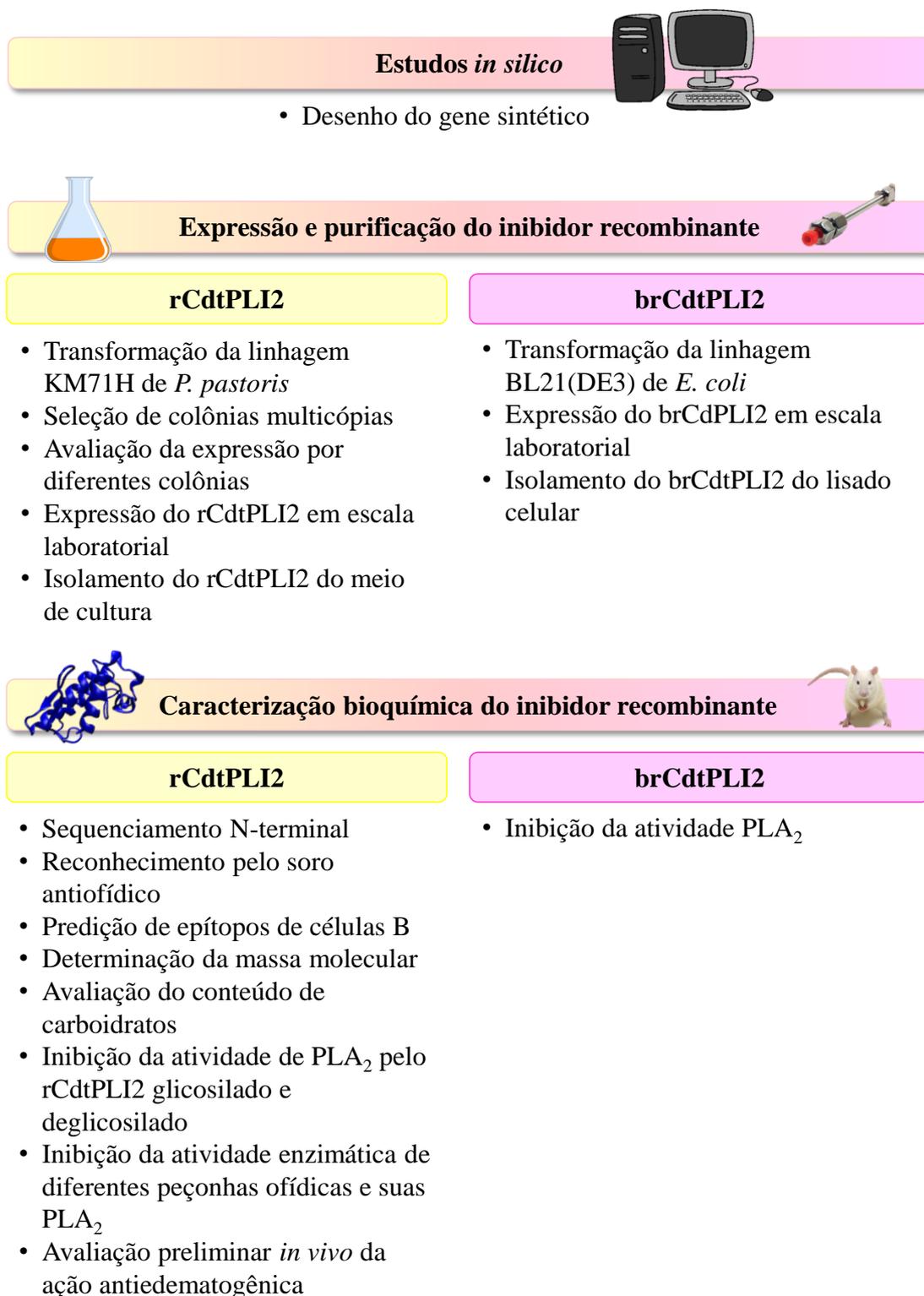


Figura 2.4 – Resumo das principais etapas realizadas na expressão e caracterização das versões recombinantes do CdtPLI-2.

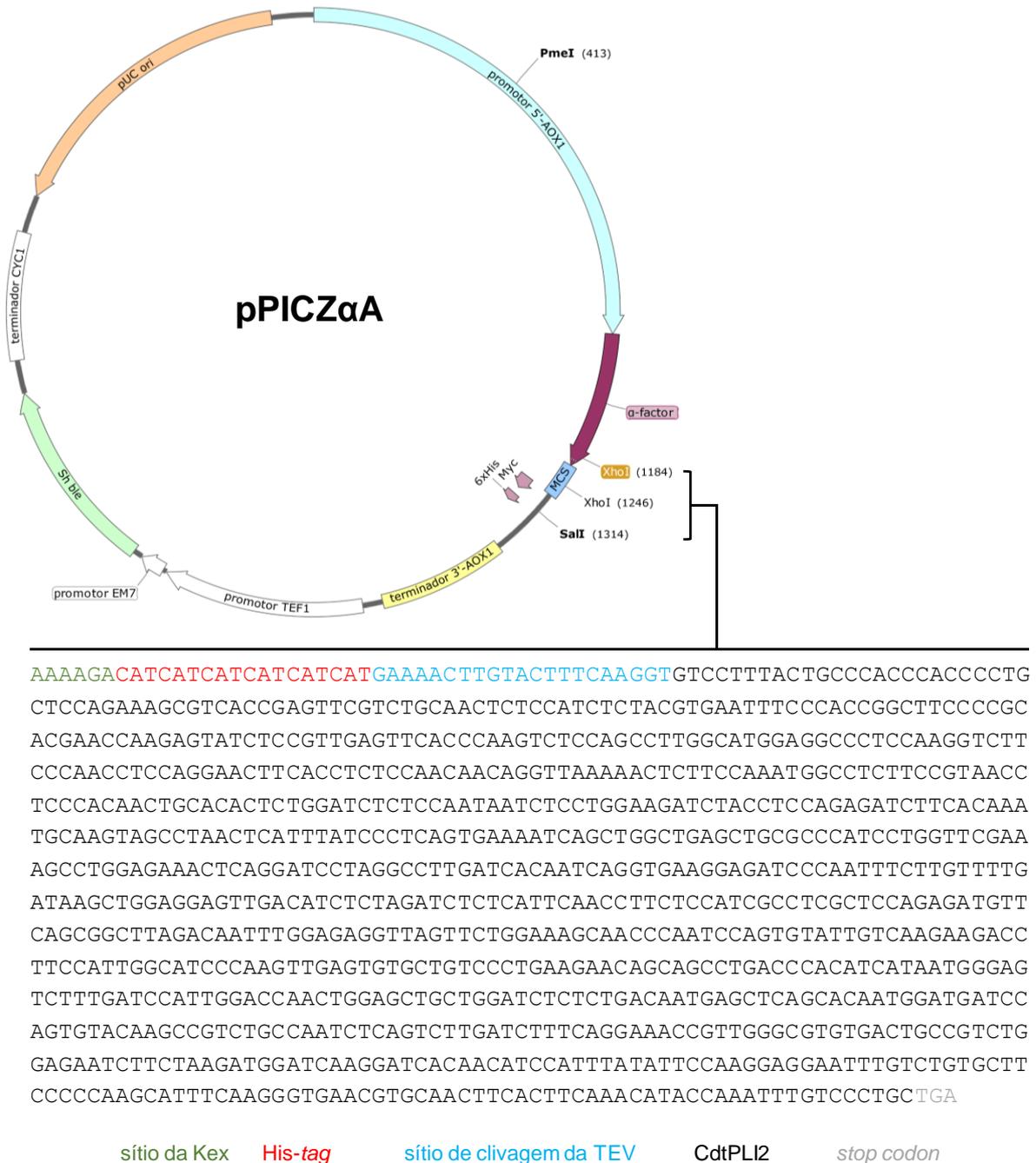
### 2.3.1 Desenho do gene sintético para expressão heteróloga em *Pichia pastoris*

A sequência de cDNA do inibidor CdtPLI-2 com códons otimizados (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>) foi utilizada no desenho do gene sintético do inibidor recombinante. O plasmídeo pPICZ $\alpha$ A recombinante (pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2) foi produzido pela empresa GenScript ([http://www.genscript.com/gene\\_synthesis.html](http://www.genscript.com/gene_synthesis.html), USA) e o inibidor recombinante foi chamado de rCdtPLI2.

O vetor pPICZ $\alpha$ A apresenta a região promotora 5' AOX1, fortemente induzida e regulada por metanol, usada para dirigir a expressão do gene que codifica a proteína de interesse (Figura 2.5). O “ $\alpha$ -factor” é um sinal de secreção de *Saccharomyces cerevisiae*, que direciona a proteína recombinante para secreção no meio de cultura celular (Figura 2.5). A seguir, está o sítio de clonagem múltipla (MCS, Figura 2.5), que contém diversos sítios para inserção do gene de interesse.

A sequência do inibidor foi clonada entre os sítios das enzimas de restrição XhoI (CTCGAG) e SalI (GTCGAC) (Figura 2.5). Na região N-terminal da proteína foi reconstituído o sítio de clivagem da kexina 2 (AAAAGA), uma protease que cliva o peptídeo sinal para liberar a proteína madura, pois esse sítio foi perdido com a escolha do primeiro sítio da XhoI. Após o sítio da Kex2, foram adicionados uma sequência (CATCATCATCATCAT) que codifica 6 histidinas (poli-His *tag*) e um sítio (GAAAACCTTGTA CTTTCAAGGT) de clivagem para a protease TEV (*Tobacco Etch Virus*). Após esses sítios, foi adicionado a sequência de cDNA do inibidor CdtPLI-2 e um códon de terminação para que a cauda de poli-His já presente no vetor não seja traduzida no C-terminal do rCdtPLI2.

Além disso, esse vetor de expressão apresenta o gene *Sh ble*, cujo produto confere resistência ao antibiótico Zeocin™ e funciona como um marcador de seleção para linhagens transformadas com o vetor pPICZ $\alpha$ A, e a região pUC ori, que é uma origem de replicação bacteriana, permitindo a replicação e manutenção do plasmídeo em linhagens de *E. coli*.



**Figura 2.5 – Vetor recombinante pPICZαA-CdtPLI2.** Figura fornecida pela empresa Thermo Fischer (Invitrogen) com modificações feitas no *software SnapGene® Viewer*.

### 2.3.2 Propagação do plasmídeo pPICZαA-CdtPLI2 em *E. coli* DH5α

Células de *E. coli* DH5α quimiocompetentes foram transformadas com 200 ng do plasmídeo pPICZαA-CdtPLI2 produzido pela empresa GenScript. A suspensão de células e o plasmídeo foram homogeneizados e deixadas em banho de gelo por 30 min. O controle negativo

consistiu na suspensão contendo apenas a bactéria quimiocompetente. Cada tubo foi aquecido na temperatura de 42 °C por 2 min e novamente transferido para o banho de gelo, onde permaneceu por 5 min. Em cada tubo, foram adicionados 270 µL de meio de cultura Luria Bertani (LB) *low salt* (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, pH 7,3) e os tubos foram mantidos sob agitação (300 rpm), a 37 °C, por 60 min. Após a incubação, as células foram inoculadas em placa contendo meio LB *low salt* ágar (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,3) com o antibiótico zeocina (25 µg/mL, Invitrogen, USA) e incubadas durante a noite em 37 °C.

A um tubo de centrífuga contendo 10 mL de meio LB *low salt* e zeocina (25 µg/mL) foi adicionada 1 colônia de *E. coli* DH5α transformada e as células foram incubadas durante a noite sob agitação (190 rpm) em 37 °C. O DNA foi extraído e purificado utilizando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega, EUA), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Após extração, a quantidade de DNA foi estimada pelo método “ácido nucléico” do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific, USA).

### 2.3.3 Linearização e purificação do vetor recombinante pPICZαA-CdtPLI2

Aproximadamente 5 µg do vetor pPICZαA-CdtPLI2 foram incubados com 10 unidades da enzima PmeI (*New England Biolabs*, USA), por 5 h, na temperatura de 37 °C, e sob agitação constante (300 rpm). A reação de linearização foi avaliada por eletroforese em gel de agarose 1%, tendo como controle negativo o vetor pPICZαA-CdtPLI2 não linearizado. O gel foi preparado a 1% em agarose em solução-tampão Tris-Acetato-EDTA (TAE, pH 8) – Tris 40 mM, acetato 20 mM, EDTA 1 mM – e a incorporação de GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain (cat: 41003, Biotium, USA) ao gel (para concentração final de 1,67X) permitiu a visualização das bandas de DNA após incidência de luz ultravioleta pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation (Bio-Rad, USA). A corrida eletroforética foi realizada no mesmo tampão TAE acima descrito, sob voltagem constante de 90 V.

O DNA linearizado foi purificado do meio reacional através de precipitação por etanol. Primeiramente, foi adicionado 1/10 do volume da reação de solução-tampão acetato de sódio 3 M (pH 5,2), seguida da adição de 2,5 vezes o volume de etanol 100% gelado. A amostra foi congelada (-80 °C) por 15 min e centrifugada (10 min, 4 °C, 13 000 *xg*). O sobrenadante foi descartado e 500 µL de etanol 80% foram adicionados. Procedeu-se nova centrifugação (10

min, 4 °C, 13 000 *xg*), o sobrenadante foi novamente descartado e aguardou-se até secar total do tubo. O DNA do tubo foi ressuspensionado em 10 µL de água *nuclease free* (Promega) e sua quantidade foi estimada pelo método “ácido nucléico” no espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific).

### 2.3.4 Transformação das células KM71H de *P. pastoris*

Células de *P. pastoris* KM71H competentes para a transformação foram preparadas como descrito por Cregg (2007).

*Pré-inóculo 1.* Células da linhagem KM71H de *P. pastoris* foram inoculadas em um tubo contendo 5 mL de meio YPD (*yeast extract peptone dextrose*; extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%), sob agitação (190 rpm), a 30 °C, entre 8-10 h.

*Pré-inóculo 2.* Uma alíquota de 50 µL do pré-inóculo 1 foi inoculada em um erlenmeyer contendo 50 mL de meio YPD e incubada durante a noite sob agitação (190 rpm), a 30 °C, até que a cultura apresentasse densidade óptica de 1,2.

*Preparo das células competentes.* O pré-inóculo 2 foi centrifugado (1500 *xg*, 4 °C, 5 min) e as células foram ressuspensionadas em 10 mL de meio YPD com HEPES 170 mM (pH 7,5). A seguir, foram adicionados 250 µL de 1,4-ditiotreitol (DTT) 1 M estéril à cultura e as células foram incubadas a 30 °C, por 15 min. Água ultrapura estéril foi adicionada à cultura para um volume final de 50 mL e as células foram novamente centrifugadas (1500 *xg*, 4 °C, 5 min). O sobrenadante foi desprezado e as células ressuspensionadas em 2 mL de sorbitol 1 M e novamente centrifugadas (1500 *xg*, 4 °C, 5 min). Descartou-se o sobrenadante e ressuspensionaram-se as células em 50 µL de sorbitol 1 M.

*Transformação.* Em um microtubo previamente esterilizado, adicionou-se 40 µL das células competentes e 8 µL (213,9 ng/µL) do plasmídeo pPICZαA-CdtPLI2 linearizado. Essa mistura foi transferida para a cubeta eletroporadora e incubada no gelo por 5 min. As células foram eletroporadas (1450 V, 5,4 ms) no eletroporador Eporator (Eppendorf, Alemanha). Imediatamente após o choque, adicionou-se 1 mL de sorbitol 1 M e as células foram transferidas para um tubo e incubadas a 30 °C, por 3 h. As células transformadas (100 µL) foram inoculadas em placa com meio YPDS (*yeast extract peptone dextrose sorbitol*) ágar (extrato de levedura 1%, peptona 2%, dextrose 2%, sorbitol 1 M e ágar 2%), contendo o antibiótico zeocina (500 µg/mL), na temperatura de 30 °C, por 2 dias.

*Seleção das colônias transformantes.* Dez colônias isoladas foram selecionadas após a etapa de transformação, inoculadas em 5 mL de meio YPD com zeocina (500 µg/mL) e incubadas durante a noite (200 rpm, 30 °C). Para cada colônia, retirou-se uma alíquota de 5 µL que foi adicionada a 15 µL de água e fervida por 5 min, a 100 °C. Nas reações de PCR realizadas, foram utilizados *primers* 5' e 3' (400 nM), Triton X-100 (1%), MgCl<sub>2</sub> (1,5 mM), Taq DNA polimerase (1,25 U), tampão da Taq (-MgCl<sub>2</sub>), dNTP *mix* (200 µM), 1 µL da colônia transformante e água ultrapura estéril (para um volume final de reação de 25 µL). Usou-se o *primer* 5' -TACTATTGCCAGCATTGCTGC-3' como primer 5' para a região do *α-factor* e o *primer* 5' -GCAAATGGCATTCTGACATCC-3' como primer 3' para a região do AOX 1. Como controle negativo, utilizou-se 1 µL de água ultrapura estéril e, como controle positivo, 1 µL do plasmídeo pPICZαA-CdtPLI2 não linearizado (128,1 ng/µL). As amostras foram aquecidas por 3 min, a 94 °C, e as etapas de PCR incluíram 35 ciclos de desnaturação, anelamento e extensão (1 min a 94 °C, 1,5 min a 55 °C e 4 min a 72 °C). A seguir, as amostras foram mantidas a 72 °C, por 7 min, e, posteriormente, resfriadas para 4 °C. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% e as bandas de DNA foram visualizadas com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

### 2.3.5 Seleção de colônias multicópias após a transformação

Colônias multicópias após transformação da *P. pastoris* com o vetor pPICZαA-CdtPLI2 foram selecionadas segundo o método de Sunga, Tolstorukov e Cregg (2008), baseado na inoculação das colônias sucessivamente em meio de cultura contendo concentrações crescentes do antibiótico marcador de seleção. As colônias positivas no ensaio de PCR (item 2.3.4) foram primeiramente inoculadas e crescidas (30 °C) em placas com meio YPD ágar com zeocina 1000 µg/mL. A seguir, foram inoculadas em placa com meio YPD ágar com zeocina 2000 µg/mL e incubadas novamente (30 °C).

Posteriormente, uma pequena alíquota de células de cada colônia foi dispersa em 20 µL de água ultrapura estéril e fervida (5 min, 100 °C). A seguir, cada colônia foi submetida ao ensaio de PCR de colônia, no qual 1 µL de cada colônia (suspensão fervida), controle positivo (108 ng/µL do plasmídeo pPICZαA-CdtPLI2 não linearizado) e negativo (água ultrapura estéril), foram adicionados à mistura reacional contendo 400 nM de cada *primer* 5' e 3', 1,25 U de Taq DNA polimerase (P1011, Sinapse Inc.), tampão do PCR 10x concentrado (Tris-HCl

100 mM, pH 8,8, KCl 500 mM, Triton X-100 1% e MgCl<sub>2</sub> 16 mM), 200 µM de dNTP mix (N9013, Sinapse Inc.) e água ultrapura estéril para um volume final de reação de 25 µL. Os *primers* e os ciclos do PCR foram os mesmos já descritos no item 2.3.4. Os produtos de PCR foram separados em gel de agarose 1% e as bandas de DNA foram visualizadas com *GelRed™ Nucleic Acid Gel Stain* (Biotium).

### 2.3.6 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 em placa *deep-well*

As colônias 1, 2, e 6, super-resistentes à zeocina e positivas no ensaio de PCR, foram submetidas a uma avaliação inicial da expressão do rCdtPLI2 em placa *deep-well*.

*Pré-inóculo.* As colônias foram inoculadas em 5 mL de meio YPD com zeocina (2000 µg/mL) e incubadas por, aproximadamente, 15 h sob agitação constante (200 rpm), a 30 °C.

*Geração de biomassa.* Para cada colônia a ser testada, 100 µL do inóculo foram inoculados em 3 mL BMGY (*Buffered Glycerol-complex Medium*; extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6, YNB 1,34%, biotina 4x10<sup>-5</sup>% e glicerol 1%) com zeocina (50 µg/mL) e incubados por 48 h, a 30 °C, sob agitação constante (210 rpm).

*Indução da expressão.* As células foram centrifugadas (1500 *xg*, 10 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante desprezado para posterior ressuspensão das células em 2 mL de BMMY (*Buffered Methanol-complex Medium*; extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, YNB 1,34%, biotina 4x10<sup>-5</sup>% e metanol 0,5%), em pH 6 ou 7. Após a ressuspensão, foi retirada uma alíquota de 50 µL da cultura para obtenção do sobrenadante após centrifugação (3000 *xg*, 4 °C, 10 min) e as células foram alimentadas com metanol puro q.s.p. 0,75% a cada 24 h, até um total de 120 h, para manter a indução da expressão. Nos tempos de 48 e 120 h também foram obtidos sobrenadantes da cultura, como descrito para o tempo zero, e a expressão foi avaliada por SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970).

### 2.3.7 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 pelas colônias nº 1, 2 e 6 em escala laboratorial pequena

*Pré-inóculo.* As colônias selecionadas foram inoculadas em um tubo (50 mL) contendo 5 mL de BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 6, YNB

1,34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$  e glicerol 1%) com zeocina (50  $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) e incubadas por, aproximadamente, 15 h, sob agitação constante (190 rpm), a 30 °C.

*Geração de biomassa.* As células foram inoculadas em um Erlenmeyer (1 L) contendo 250 mL de BMGY, para geração de biomassa, e realizou-se incubação sob agitação constante (190 rpm), a 30 °C, até as células atingirem  $\text{DO}_{600}$  entre 2 e 6 (aproximadamente, 24 h).

*Indução da expressão.* As células foram centrifugadas (1500  $\times g$ , 5 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante desprezado. As culturas foram ressuspensas em 50 mL de BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 7, YNB 1,34%, biotina  $4 \times 10^{-5}\%$  e metanol 0,5%) com casaminoácidos 1,5% e transferidas para um Erlenmeyer (250 ou 500 mL) e incubadas (190 rpm, 26 °C) durante 120 h. Retirou-se uma alíquota de 100  $\mu\text{L}$  de meio de cultura representando o tempo zero de expressão, que foi centrifugada (3000  $\times g$ , 4 °C, 10 min), para armazenamento do sobrenadante, e alimentou-se a colônia com metanol para concentração final de 0,75%. A cada 24 h, nova alíquota de meio de cultura foi retirada para obtenção do sobrenadante e a cultura alimentada com metanol q.s.p. 0,75%, até o total de 120 h de indução da expressão. As expressões foram avaliadas por SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970).

*Purificação do rCdtPLI2.* O sobrenadante da cultura celular foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel (3 mL, Ni-NTA Agarose, QIAGEN), com modificações do método proposto por Boldrini-França *et al.* (2015). A coluna foi equilibrada com tampão A (Tris-HCl 10 mM,  $\text{NaH}_2\text{PO}_4$  50 mM e NaCl 100 mM, pH 8) e o inibidor recombinante foi separado das proteínas da *P. pastoris* através de um gradiente de imidazol (0-250 mM) nesse mesmo tampão, sendo 3 volumes de coluna (CV) com 10 mM, 2 CV com 50 mM (coletados em duas frações de 3 mL cada), 2 CV com 100 mM (coletados em duas frações de 3 mL cada), 3 CV com 250 mM de imidazol (coletados em frações de 3 mL cada). As frações contendo o rCdtPLI2, cuja visualização foi feita através de SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970), em conjunto com o método de coloração por prata (KAVRAN; LEAHY, 2014), foram reunidas e concentradas em Amicon<sup>®</sup> Ultra-15 10K (Merck Millipore, EUA) e lavadas com Tris-HCl 50 mM (pH 8) para retirada do imidazol. As frações concentradas foram diluídas em água e ácido trifluoroacético (TFA) q.s.p. 0,1% e aplicadas na coluna de fase reversa Jupiter<sup>®</sup> 5 $\mu$  C4 300 Å (250 x 4,6 mm, Phenomenex, EUA), previamente equilibrada com TFA 0,1%. As frações da cromatografia de fase reversa foram eluídas através de um

gradiente de acetonitrila (ACN, 0-80%) em TFA 0,1%, sob vazão de 1 mL/min, e monitoradas pelo sistema Äkta pure (GE Healthcare, Suécia) em 214 nm.

### 2.3.8 Expressão e purificação do rCdtPLI2 pela colônia nº 2 em escala laboratorial

*Pré-inóculo.* A colônia foi inoculada em um Erlenmeyer (125 mL) contendo 10 mL de BMGY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM pH 6, YNB 1,34%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ % e glicerol 1%) com zeocina (100  $\mu$ g/mL) e incubada por, aproximadamente, 15 h sob agitação constante (190 rpm), a 30 °C.

*Geração de biomassa.* As células foram inoculadas em um Erlenmeyer (2 L) contendo 500 mL de BMGY, para geração de biomassa, e realizou-se incubação sob agitação constante (190 rpm), a 30 °C até as células atingirem DO<sub>600</sub> entre 2 e 6 (aproximadamente, 24 h).

*Indução da expressão.* As células foram centrifugadas (1500  $xg$ , 5 min, temperatura ambiente) e o sobrenadante desprezado. As culturas foram ressuspensas em 100 mL de BMMY (extrato de levedura 1%, peptona 2%, fosfato de potássio 100 mM, pH 7, YNB 1,34%, biotina  $4 \times 10^{-5}$ % e metanol 0,5%) com casaminoácidos 1,5%, transferidas para um Erlenmeyer (1 L) e incubadas (190 rpm, 26 °C) durante 120 h. Retirou-se uma alíquota de 100  $\mu$ L de meio de cultura representando o tempo zero de expressão, que foi centrifugada (3000  $xg$ , 4 °C, 10 min), para armazenamento do sobrenadante, e alimentou-se a colônia com metanol, para concentração final de 0,75%. A cada 24 h, nova alíquota de meio de cultura foi retirada, para obtenção do sobrenadante, e a cultura alimentada com metanol q.s.p. 0,75% até o total de 120 h de indução da expressão. A expressão foi avaliada por SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970) utilizando as alíquotas coletadas em diferentes tempos de expressão.

*Purificação.* Primeiramente, o sobrenadante da cultura celular foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel (3 mL, Ni-NTA Agarose, QIAGEN), previamente equilibrada com tampão A (Tris-HCl 10 mM, NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM e NaCl 100 mM, pH 8). O inibidor recombinante foi separado das proteínas da *P. pastoris* através de um gradiente de imidazol (0-250 mM) nesse mesmo tampão, sendo 2 CV com 0 mM coletados como “lavado”, 3 CV com 10 mM, 5 CV com 100 mM coletados em 2 frações com 7,5 mL cada e 3 CV com 250 mM de imidazol coletados com 3 mL cada uma. As frações da cromatografia foram analisadas por SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970) e os géis foram

corados pelo método de coloração por prata (KAVRAN; LEAHY, 2014) ou com *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue G-250* (Sigma, EUA) para visualização das bandas de proteínas.

As frações contendo o inibidor foram reunidas ou submetidas separadamente a cromatografia de filtração molecular na coluna *HiTrap Desalting G25* (5 mL, *GE Healthcare*) previamente equilibrada com TFA 0,05%. Para isso, foi realizada eluição isocrática nessa mesma solução e o sistema *Äkta purifier UPC-10* (*GE Healthcare*) realizou medidas de absorvância em 280 nm. A amostra dessalinizada foi adicionada de TFA q.s.p. 0,1% e fracionada por cromatografia de fase reversa como descrito no item 2.3.7, mas monitorada pelo sistema *Äkta purifier UPC-10* em 280 nm.

### **2.3.9 Confirmação da expressão do rCdtPLI2**

A sequência primária do N-terminal do rCdtPLI2 foi obtida através do método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967) em um sequenciador de proteínas automatizado (Sistema PPSQ-33A, Shimadzu, Japão). O aminoácido derivado da reação com o PITC é convertido a PTH-aminoácido que é, então, separado por cromatografia de fase reversa (RP-HPLC) e quantificado/identificado através de comparação com padrão de 25 pmol analisado no início de cada sequenciamento.

### **2.3.10 Reconhecimento do rCdtPLI2 pelo soro anticrotálico comercial**

A avaliação do reconhecimento do inibidor recombinante rCdtPLI2 pelo soro anticrotálico comercial foi realizada através do método *Enzyme Linked Immunosorbent Assay* (ELISA). Para isso, uma microplaca de 96 poços foi sensibilizada com 2 µg de cada amostra-teste: rCdtPLI2, peçonha de *C. d. collilineatus* (CdcV), peçonha de *C. d. terrificus* (CdtV), crotoxina de *C. d. collilineatus* (CTx-Cdc) e a cadeia básica da crotoxina de *C. d. collilineatus* (CB-Cdc). A cada uma dessas amostras foi adicionado previamente tampão carbonato/bicarbonato 50 mM (pH 9,6) em q.s.p. 100 µL. Para o controle positivo do experimento, a microplaca foi sensibilizada com soro de cavalo não-imunizado (H0146-5 mL, Sigma), diluído 1:50 em tampão carbonato/bicarbonato 50 mM (pH 9,6) q.s.p. 100 µL. A placa foi incubada durante a noite em 4 °C.

Após esse período, o conteúdo dos poços foi descartado e a placa lavada com solução salina tamponada com fosfato (PBS, pH 7,2). A seguir, foi adicionado PBS-leite (MPBS, 2%) para bloqueio da placa e esta foi incubada por 2 h, a 37 °C, e, posteriormente, lavada novamente com PBS (pH 7,2). Em todos os poços, foi adicionado soro anticrotálico comercial produzido pelo Instituto Butantan (diluído 1:100 em MPBS 1%) e a placa foi incubada por 1 h, a 37 °C. Para o controle negativo de cada amostra, o soro anticrotálico comercial (anticorpo-primário) foi substituído pelo soro de cavalo não-imunizado na mesma diluição.

A placa foi, então, lavada com solução de PBS (pH 7,2)-Tween 0,05% e depois com PBS (pH 7,2). Após isso, anticorpos anti-cavalo conjugados com peroxidase (Sigma A6917-1 mL) diluídos 1:3000 em MPBS 1% foram adicionados em cada poço e a placa foi incubada por 1 h em 37 °C. Procedeu-se nova lavagem da placa com PBS (pH 7,2)-Tween 0,05% e depois com PBS (pH 7,2).

Em seguida, foi adicionado o substrato para a peroxidase conjugada com o anticorpo (SIGMAFAST#OPD, P8197, Sigma) para o desenvolvimento de cor nos poços em que a amostra foi reconhecida pelo anticorpo. A reação foi interrompida com H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 1 M e a absorbância de todos os poços foi mensurada em 490 nm pelo leitor de microplacas Sunrise™. O ensaio foi realizado em quadruplicata e os resultados analisados pelo *software* GraphPad Prism 6.01 (GraphPad Software, EUA) por *two-way* ANOVA (análise de variância) seguido do teste de Bonferroni para comparações múltiplas, sendo estatisticamente significante quando  $p < 0,05$ .

Para avaliar possível reconhecimento inespecífico pelos anticorpos anti-cavalo conjugados com peroxidase (anticorpo secundário), este foi utilizado como anticorpo primário durante o experimento. Nesse caso, os resultados foram analisados por *one-way* ANOVA, sendo estatisticamente significante quando  $p < 0,05$ .

### 2.3.11 Predição de epítomos lineares de células B

A predição de epítomos lineares de células B foi realizada pelo servidor ABCpred (SAHA; RAGHAVA, 2006) disponível em: <https://webs.iiitd.edu.in/raghava/abcpred/index.html>. Para isso, utilizaram-se os parâmetros *threshold* de 0,9 e comprimento da janela de 14-16 aminoácidos.

### 2.3.12 Inibição da atividade fosfolipásica pelo rCdtPLI2 glicosilado

#### 2.3.12.1 Isolamento das toxinas

*CTx-Cdc*. Aproximadamente 70 mg da peçonha de *C. d. collilineatus* foram ressuspensos em tampão bicarbonato de amônio 0,1 M (pH 7,74) e centrifugados (13000 *xg*, 10 min, temperatura ambiente). A seguir, o sobrenadante foi filtrado em uma coluna *HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-100 HR* (GE Healthcare) previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,1 M (pH 7,74). A eluição das amostras seguiu um gradiente isocrático nesse mesmo tampão, sob vazão de 0,5 mL/min, e foi monitorada em 214 nm pelo sistema Äkta purifier UPC-10. A fração S4 foi dessalinizada através de eluição isocrática na coluna *HiTrap Desalting G25* (5 mL, GE Healthcare) previamente equilibrada com TFA 0,05%. A eluição da amostra foi monitorada pelo sistema Äkta pure (GE Healthcare) em 280 nm e a fração S4 dessalinizada foi liofilizada para posterior uso. Para checagem do grau de pureza, a fração S4 foi solubilizada em TFA 0,1% e submetida a cromatografia de fase reversa em coluna *Vydac®* com resina C18 (250 x4,6 mm, GRACE, EUA) como descrito por Boldrini-França *et al.* (2010). A eluição das amostras foi monitorada pelo sistema Äkta purifier UPC-10 em 214 nm.

*CB-Cdc*. Cerca de 50 mg da peçonha de *C. d. collilineatus* foram ressuspensos em 500 µL de TFA 0,1% e 5 µL de ácido fórmico e centrifugados (13000 *xg*, 10 min, temperatura ambiente). As proteínas solúveis da peçonha foram fracionadas por cromatografia de fase reversa segundo modificações no método de Calvete, Juárez e Sanz (2007). Para isso, o sobrenadante foi aplicado em uma coluna semi-preparativa *Jupiter® C18* (5 µm, 300 Å, 250 x 10 mm, Phenomenex) previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição das amostras seguiu um gradiente segmentado (0-100%) de solução B (ACN 80% em TFA 0,1%), sob vazão de 5 mL/min, e foi monitorada em 214 nm pelo sistema Äkta purifier UPC-10.

#### 2.3.12.2 Atividade enzimática sobre substrato cromogênico

O ensaio de atividade foi realizado com base no método de Petrovic *et al.* (2001) sobre o substrato *4-Nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid* (NOB, Enzo Life Sciences, Inc., EUA). O NOB foi solubilizado em etanol 100% (10 mg/mL) e incubado (37 °C) com as amostras e tampão Tris-HCl 50 mM com KCl 150 mM e CaCl<sub>2</sub> 10 mM (pH 7,5), para concentração final de 500 µM. As amostras consistiram em 2 µg de CB-Cdc ou CTx-Cdc pré-incubadas (37 °C, 15 min, 300 rpm) com o rCdtPLI2 glicosilado (2, 4 ou 8 µg), sendo o controle positivo a

atividade enzimática de 2 µg de CB-Cdc ou CTx-Cdc na ausência de inibidor. Também foram incubados com o substrato 8 µg de rCdtPLI2 glicosilado como controle.

Após 120 minutos de incubação, a absorbância das amostras foi lida em 425/600 nm pelo leitor de microplacas Sunrise™, sendo a atividade fosfolipásica diretamente relacionada com o aumento da absorbância. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 6.01 por *one-way* ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparações múltiplas. As amostras foram comparadas ao controle positivo (CB-Cdc ou CTx-Cdc) e os resultados foram expressos como a média ± o desvio padrão, sendo considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 2.3.13 Avaliação do conteúdo de carboidratos

*Análise de N-glicosilações.* Para analisar as N-glicosilações presentes no rCdtPLI2, uma alíquota do inibidor foi reduzida conforme já realizado por Wiezel *et al.* (2019). Para isso, ~15 µg de rCdtPLI2 solubilizados em 24 µL de tampão bicarbonato de amônio 20 mM (pH 8) foram adicionados de 2 µL de SDS 5% e 2 µL de DTT 1 M e mantidos em 95 °C por 10 min. A seguir, a amostra foi deixada em temperatura ambiente por 5 min e adicionada de 4 µL de Triton X-100 10%. Para a reação de deglicosilação, foi adicionado 1 µL de PNGase F (*Peptide-N-glycosidase F*, 5000 U/mL, G5166, Sigma) e a amostra foi incubada em 37 °C e 300 rpm (ThermoMixer C) por 4 h. Em seguida, a amostra foi mantida em 100 °C por 5 min, para parar a reação, e armazenada em -20 °C até o momento do uso. Como controle positivo de glicosilação, foram utilizados ~15 µg de rCdtPLI2 que foram submetidos a todas as etapas anteriores exceto a adição de PNGase F. As amostras foram avaliadas por SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970) e aplicadas (em duplicata) no gel. Metade do gel foi corado com *Coomassie*® *Brilliant Blue G-250* e a outra metade foi corado com ácido periódico de Schiff (PAS) para coloração das glicosilações (DOERNER; WHITE, 1990).

*Análise de O-glicosilações.* Para a análise das O-glicosilações, foram utilizadas 3 amostras com, aproximadamente, 30 µg de rCdtPLI2 cada. A primeira amostra foi apenas reduzida como descrito acima e utilizada como controle positivo de glicosilação. A terceira amostra foi submetida à N-deglicosilação com 2 µL de PNGase F (10000 U/mL, Promega), por 3 h, seguindo o protocolo do parágrafo anterior. Em seguida, a segunda e a terceira amostras foram adicionadas de tampão acetato de sódio 1 M (pH 4), até obter pH próximo a 4, e de 0,5

unidades da enzima  $\alpha$ -manosidase (M7257, Sigma) e incubadas por 2 h (300 rpm), a 25 °C. As três amostras foram aplicadas em duplicatas em dois géis de SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970). Um gel foi corado com *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue G-250* e o outro foi corado com PAS (DOERNER; WHITE, 1990) para análise das glicosilações.

#### **2.3.14 Determinação da massa molecular do rCdtPLI2**

Uma amostra contendo ~10  $\mu$ g de rCdtPLI2 foi diluída na proporção 1:1 com matriz de ácido sinapínico (5 mg/mL) em TFA 0,1% e ACN 50%, aplicada em uma placa de MALDI (do inglês, *Matrix Assisted Laser Desorption/Ionization*) e deixada à temperatura ambiente para evaporação do solvente. A massa molecular do inibidor foi determinada por espectrometria de massas do tipo MALDI-TOF (MALDI-TOF MS) usando o sistema Ultraflex II MALDI TOF/TOF (Bruker Daltonics, EUA). O equipamento foi calibrado na faixa de 20000-70000 Da (Protein Standard II for Mass Spectrometry, Bruker Daltonics) e operado em modo linear positivo com 2500 *shots* por espectro. Os dados foram analisados pelo *software* flexAnalysis versão 3.4.76.0 (Bruker Daltonics).

#### **2.3.15 Avaliação preliminar da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre PLA<sub>2</sub> de serpentes**

Para a N-deglicosilação do rCdtPLI2, 85  $\mu$ g do inibidor foram solubilizados em tampão bicarbonato de amônio 50 mM e digeridos com 8,5  $\mu$ L de PNGase F (V4831, Promega) seguindo instruções do fabricante. A reação de deglicosilação foi mantida em 37 °C durante 6 h, sob agitação de 300 rpm (ThermoMixer C). Como controle da N-deglicosilação, 30  $\mu$ g de rCdtPLI2 em tampão bicarbonato de amônio 50 mM foram incubados nas mesmas condições acima (item 2.3.13).

Para a deglicosilação com alfa-manosidase, 100  $\mu$ g do rCdtPLI2 em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4) foram incubados em 25 °C com 0,5 U de alfa-manosidase (M7257, Sigma), durante 3 h e sob agitação de 300 rpm (ThermoMixer C). Como controle da deglicosilação com alfa-manosidase, 20  $\mu$ g de rCdtPLI2 em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4) foram incubados nas mesmas condições acima (item 2.3.13).

A seguir, a SDS-PAGE 10% (LAEMMLI, 1970) foi realizada com uma alíquota de cada amostra e o gel foi corado com *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue G-250* para visualização das bandas de proteínas. O restante da amostra foi submetido ao ensaio de inibição da atividade fosfolipásica sobre o substrato cromogênico NOB (item 2.3.12.2). Para isso, 2 µg de CB-Cdc/CTx-Cdc foram pré-incubados (37 °C, 15 min, 300 rpm) com 2 ou 4 µg do rCdtPLI2 pós-ensaio de deglicosilação, ou apenas com a solução-tampão do ensaio para controle de cada reação (controle positivo). O controle negativo consistiu em 4 µg do rCdtPLI2 pós-ensaio de deglicosilação. Nesse ensaio, também foi avaliada a atividade inibitória do rCdtPLI2 glicosilado, que permaneceu armazenado em, aproximadamente, 4 °C na geladeira, paralelamente aos ensaios de deglicosilação. A absorbância de cada amostra foi lida após 120 min de incubação.

### **2.3.16 Avaliação da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre diferentes peçonhas ofídicas**

A ação inibitória do rCdtPLI2 sobre diferentes peçonhas ofídicas brasileiras de interesse médico foi avaliada através do ensaio de atividade fosfolipásica sobre o substrato NOB (item 2.3.12.2). Amostras das peçonhas de *B. jararacussu*, *B. neuwiedii*, *B. moojeni*, *B. jararaca*, *L. muta*, *C. d. cascavella*, *C. d. terrificus* e *C. d. collilineatus* foram dispersas em Tris-HCl 100 mM (pH 7,4) e centrifugadas (4 °C, 10000 *xg*, 10 min). O precipitado foi armazenado e o sobrenadante de cada amostra de peçonha teve a quantidade de proteínas estimada pela sua absorbância em 280 nm no espectrofotômetro NanoDrop<sup>™</sup> 2000. Cerca de 70 µg de cada peçonha foram aplicados em um gel de SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970), que foi, posteriormente, corado com *Coomassie*<sup>®</sup> *Brilliant Blue G-250* para visualização das bandas de proteínas.

Para o ensaio de inibição da atividade fosfolipásica, o inibidor foi previamente submetido a reação de deglicosilação pela enzima alfa-manosidase. Sendo assim, 145 µg do rCdtPLI2 em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4) foram incubados (25 °C, 2 h, 300 rpm) com 0,72 U de alfa-manosidase (M7257, Sigma). Em seguida, 20 µg de cada peçonha foram pré-incubados (15 min, 37 °C) com 2 µg do rCdtPLI2 deglicosilado, com exceção das peçonhas de *B. jararaca* e *L. muta*, para as quais foram incubados 40 µg de cada peçonha com 4 µg do inibidor deglicosilado. Os controles positivos da reação consistiram nas amostras de peçonha

sem adição do inibidor, mas pré-incubadas (37 °C, 15 min) com o tampão de atividade. A seguir, todas as amostras foram incubadas com o substrato (37 °C, 120 min) e a absorbância foi lida em 425/600 nm pelo leitor de microplacas Sunrise™, sendo a inibição da atividade fosfolipásica diretamente relacionada com a diminuição da absorbância.

### 2.3.17 Inibição de fosfolipases ácidas e básicas pelo rCdtPLI2 deglicosilado

#### 2.3.17.1 Isolamento da Lmr-PLA<sub>2</sub>

A Lmr-PLA<sub>2</sub> foi isolada conforme já descrito por Cordeiro *et al.* (2015). Para isso, 25 mg da peçonha de *L. muta* foram dispersos em 500 µL de tampão acetato de sódio 50 mM com NaCl 0,15 M (pH 6) e centrifugados (12000 xg, 4 °C, 10 min). O sobrenadante foi filtrado com gradiente isocrático na coluna *HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-100 HR* (GE Healthcare), previamente equilibrada com o mesmo tampão, sob vazão de 0,5 mL/min. A eluição das amostras foi monitorada pelo sistema Äkta pure em 214 nm. A seguir, a fração LmS-G foi diluída em TFA 0,1% e submetida a cromatografia de fase reversa em uma coluna C18 (25 x 0,46 cm, 3 µm, Phenomenex), previamente equilibrada com TFA 0,1%. As amostras foram eluídas por um gradiente (0-100%) de solução B (ACN 80% em TFA 0,1%) sob vazão de 1 mL/min e monitoradas pelo sistema Äkta purifier UPC-10 em 280 nm.

#### 2.3.17.2 Avaliação da atividade inibitória

Primeiramente, o rCdtPLI2 foi deglicosilado pela enzima alfa-manosidase. Para isso, 25 µg do inibidor foram incubados (25° C, 2 h) com 0,125 unidades de alfa-manosidase (M7257, Sigma) em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4), sob agitação (300 rpm, ThermoMixer C), como já descrito anteriormente.

A seguir, para avaliar a ação do rCdtPLI2 deglicosilado sobre PLA<sub>2</sub>s ácidas e básicas, 13,8x10<sup>-5</sup> µmol de cada toxina (CTx-Cdc, CB-Cdc e Lmr-PLA<sub>2</sub>) foram pré-incubados (15 min, 37 °C) em diferentes proporções inibidor:toxina (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000) com o rCdtPLI2 pós-reação com alfa-manosidase (item 2.3.13). A seguir, procedeu como descrito no item 2.3.12.2. O substrato NOB foi adicionado e as amostras incubadas por 120 min, a 37 °C. Os controles positivos consistiram em 13,8x10<sup>-5</sup> µmol de cada toxina na ausência do inibidor. A absorbância das amostras foi lida em 425/600 nm pelo leitor de microplacas Sunrise™, sendo a inibição da atividade fosfolipásica diretamente relacionada com a diminuição da absorbância.

### 2.3.18 Avaliação preliminar *in vivo* da atividade antiedematogênica do rCdtPLI2

O ensaio de atividade edematogênica, realizado conforme Bordon *et al.* (2012), seguiu os Princípios Éticos na Experimentação Animal adotadas pelo Comitê de Ética no Uso de Animais (CEUA) da FCFRP-USP e está registrado sob o nº 17.1.126.60.6 (ANEXO B).

*Deglicosilação do rCdtPLI2.* Para a deglicosilação rCdtPLI2, 100 µg do inibidor em tampão acetato de sódio 100 mM (pH 4) estéril foram incubados (25 °C, 2 h) com 0,5 unidades de alfa-manosidase (M7257, Sigma) sob agitação constante (300 rpm, ThermoMixer C).

*Experimentação animal 1.* O rCdtPLI2 ( $13,8 \times 10^{-5}$  µmol/animal) antes e após a deglicosilação foi incubado (15 min, 37 °C) com  $27,6 \times 10^{-5}$  µmol/animal de CB-Cdc e CTx-Cdc (proporção 1:2, inibidor:toxina). Camundongos machos da linhagem *Swiss* foram divididos em 8 grupos (n=4) em que foram administrados: i) rCdtPLI2 deglicosilado; ii) rCdtPLI2 glicosilado; iii) CB-Cdc; iv) CB-Cdc + rCdtPLI2 deglicosilado; v) CB-Cdc + rCdtPLI2 glicosilado; vi) CTx-Cdc; vii) CTx-Cdc + rCdtPLI2 deglicosilado e viii) CTx-Cdc + rCdtPLI2 glicosilado. A administração das amostras foi realizada através da via subcutânea na pata direita traseira. A espessura da pata foi medida antes (t = 0 min) e após a administração de cada amostra (t = 30, 60, 120, 180 e 240 minutos) com um paquímetro de baixa pressão. O aumento na espessura da pata dos camundongos foi expresso como a porcentagem de edema induzido calculado pela seguinte fórmula:

$$\text{Edema (\%)} = \frac{\text{Espessura no tempo } t - \text{Espessura inicial}}{\text{Espessura inicial}} \times 100$$

*Experimentação animal 2.* O rCdtPLI2 ( $13,8 \times 10^{-5}$  µmol/animal) antes e após a deglicosilação foi incubado (15 min, 37 °C) com  $13,8 \times 10^{-5}$  µmol/animal de CTx-Cdc (proporção 1:1, inibidor:toxina). Camundongos machos da linhagem *Swiss* foram divididos em 5 grupos (n=2) em que foram administrados: i) rCdtPLI2 deglicosilado; ii) CTx-Cdc; iii) CTx-Cdc + rCdtPLI2 deglicosilado e iv) CTx-Cdc + rCdtPLI2 glicosilado. A administração das amostras e a medida da espessura da pata dos camundongos foram realizadas como descrito na experimentação animal 1.

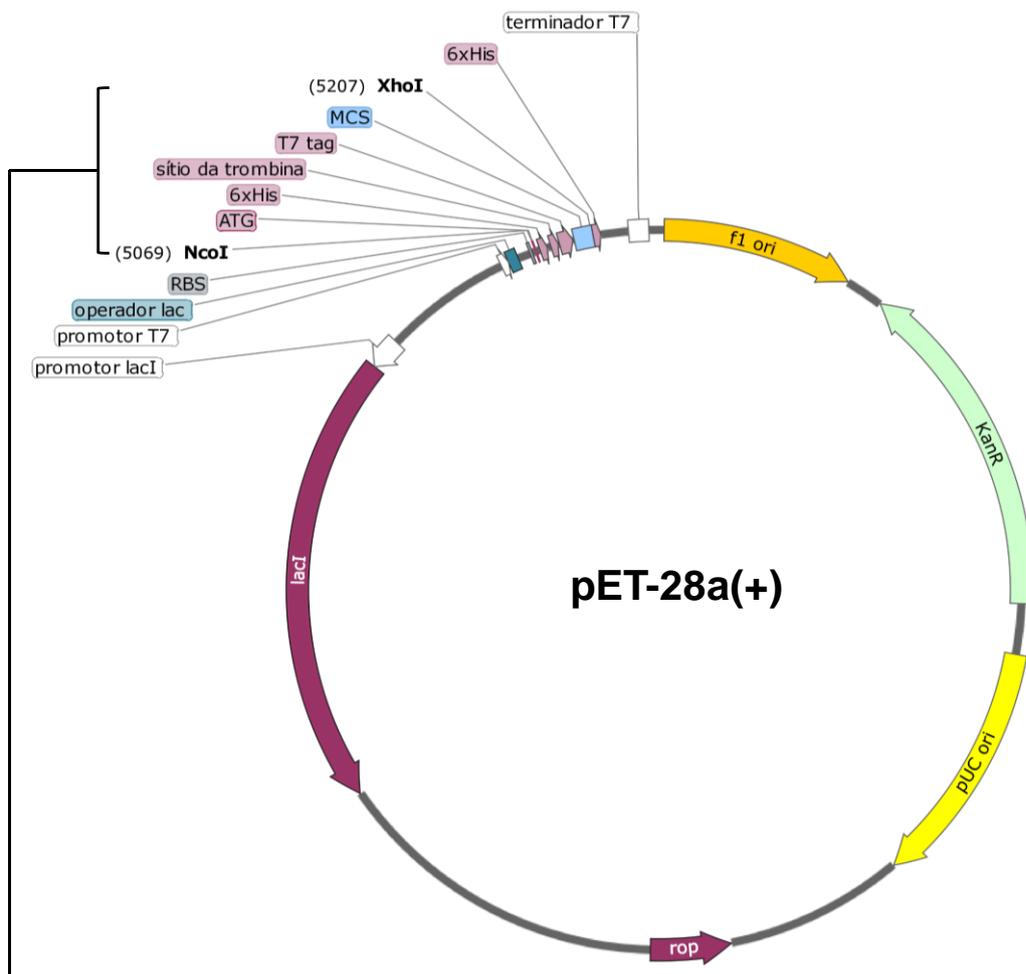
*Análise estatística.* Os resultados obtidos foram analisados por *two-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. Os resultados foram expressos como média ± desvio padrão e as diferenças consideradas estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

### 2.3.19 Desenho do gene sintético para expressão do inibidor recombinante em *E. coli*

A sequência de cDNA do inibidor CdtPLI2, com códons otimizados para expressão em *E. coli*, foi utilizada no desenho do gene sintético do inibidor recombinante brCdtPLI2. Essa denominação o diferencia do inibidor recombinante expresso em *P. pastoris*, mas a sequência primária dos dois inibidores é idêntica. O vetor pET-28a(+) recombinante (brCdtPLI2\_pET-28a(+)) foi produzido pela empresa GenScript ([http://www.genscript.com/gene\\_synthesis.html](http://www.genscript.com/gene_synthesis.html), EUA).

O vetor pET-28a(+) usa o promotor da RNA polimerase do bacteriófago T7 para a síntese da proteína de interesse. Na ausência de IPTG (isopropil β-D-1-tiogalactopiranosida) ou lactose, o repressor LacI está ligado ao promotor induzível *lacUV5* (promotor *lacI*), reprimindo a transcrição e síntese da RNA polimerase T7. Na presença de IPTG/lactose, o LacI é liberado do operador e o gene da RNA polimerase T7 é transcrito e traduzido. Então, a RNA polimerase T7 é capaz de ativar a transcrição do promotor T7 localizado no vetor pET, para expressão do gene de interesse clonado no vetor (OVERTON, 2014).

A sequência que codifica o brCdtPLI2 foi inserida entre os sítios para as enzimas de restrição NcoI e XhoI (Figura 2.6). Nessa sequência, foi reconstituído o códon de iniciação (ATG) e, a seguir, tem-se uma His-tag N-terminal seguida do sítio de clivagem para a protease TEV, a sequência do inibidor e um códon de terminação, para a não codificação da His-tag C-terminal já presente no vetor pET-28a(+). Esse vetor ainda apresenta o gene KanR, que codifica uma proteína que confere resistência ao antibiótico canamicina, funcionando como marcador de seleção para células transformadas com esse vetor.



ATGCATCATCATCATCATGAAAACCTTGTACTTTCAAGGTGTCCTTTACTGCCACCCACCCCTGCTC  
 CAGAAAGCGTCACCGAGTTTCGTCTGCAACTCTCCATCTCTACGTGAATTTCCCACCGGCTTCCCGCAG  
 AACCAAGAGTATCTCCGTTGAGTTCACCCAAGTCTCCAGCCTTGGCATGGAGGCCCTCCAAGGTCTTCCC  
 AACCTCCAGGAACCTCACCTCTCCAACAACAGGTTAAAAACTCTTCCAATGGCCTCTTCCGTAACCTCC  
 CACAACCTGCACACTCTGGATCTCTCCAATAATCTCCTGGAAGATCTACCTCCAGAGATCTTACAAATGC  
 AAGTAGCCTAACTCATTTATCCCTCAGTGAAAATCAGCTGGCTGAGCTGCGCCCATCTGGTTTCGAAAGC  
 CTGGAGAAACTCAGGATCCTAGGCCTTGATCACAATCAGGTGAAGGAGATCCCAATTTCTTGTTTTGATA  
 AGCTGGAGGAGTTGACATCTCTAGATCTCTCATTCAACCTTCTCCATCGCCTCGCTCCAGAGATGTTTCAG  
 CGGCTTAGACAATTTGGAGAGGTTAGTTCTGGAAAGCAACCCAATCCAGTGTATGTCAAGAAGACCTTC  
 CATTGGCATCCCAAGTTGAGTGTGCTGTCCCTGAAGAACAGCAGCCTGACCCACATCATAATGGGAGTCT  
 TTGATCCATTGGACCAACTGGAGCTGCTGGATCTCTCTGACAATGAGCTCAGCACAATGGATGATCCAGT  
 GTACAAGCCGTCTGCCAATCTCAGTCTTGATCTTTTCAGGAAACCGTTGGGCGTGTGACTGCCGTCTGGAG  
 AATCTTCTAAGATGGATCAAGGATCACAAATCCATTTATATCCAAGGAGGAATTTGTCTGTGCTTCCC  
 CCAAGCATTTC AAGGGTGAACGTGCAACTTCACTTCAAACATACCAAATTTGTCCCTGCTGA

códon de iniciação    His-tag    sítio de clivagem da TEV    CdtPLI2    códon de terminação

**Figura 2.6 – Vetor recombinante brCdtPLI2\_pET-28a(+).** Figura fornecida pela empresa Millipore Sigma (Novagen) com modificações feitas no software *SnapGene® Viewer*.

### 2.3.20 Propagação do vetor brCdtPLI2\_pET-28a(+) em *E. coli* DH5α

Células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas com 200 ng do vetor recombinante brCdtPLI2\_pET-28a(+). A suspensão de células e o plasmídeo foram homogeneizados e deixadas em banho de gelo por 30 min. O controle negativo consistiu na suspensão contendo apenas a bactéria competente. Cada tubo foi aquecido na temperatura de 42 °C por 2 min e novamente transferido para o banho de gelo, onde permaneceu por 5 min. Em cada tubo, foram adicionados 270 µL de meio de cultura LB (triptona 1%, extrato de levedura 1%, NaCl 0,5%, pH 7,3) e os tubos foram mantidos sob agitação (300 rpm), a 37 °C, por 60 min. Após a incubação, as células foram inoculadas em placa contendo meio LB ágar (triptona 1%, extrato de levedura 0,5%, NaCl 0,5%, ágar 1,5%, pH 7,3) com o antibiótico canamicina (30 µg/mL, Sigma) e incubadas durante a noite a 37 °C.

No dia seguinte, a um tubo de centrífuga contendo 10 mL de meio LB e canamicina (30 µg/mL) foi inoculada 1 colônia transformada de *E. coli* DH5α e as células foram incubadas durante a noite sob agitação (190 rpm) a 37 °C. O DNA foi extraído e purificado utilizando o kit *Wizard® Plus SV Minipreps DNA Purification System* (Promega), seguindo o protocolo disponibilizado pelo fabricante. Após extração, a quantidade de DNA foi estimada pelo método “ácido nucléico” do espectrofotômetro NanoDrop™ 2000 (Thermo Fisher Scientific) e o material foi visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% (item 2.3.3).

### 2.3.21 Expressão e purificação do brCdtPLI2 em escala laboratorial

Células de *E. coli* BL21(DE3)pLysS foram transformadas com o vetor brCdtPLI2\_pET-28a(+) como descrito no item 2.3.10. Para expressão do brCdtPLI2 em escala laboratorial, foram realizados primeiramente dois pré-inóculos, contendo 10 µL do glicerol estoque de células BL21(DE3)pLysS transformadas em 10 mL de meio LB com canamicina 30 µg/mL, incubados a 37 °C (190 rpm) durante, aproximadamente, 15 h. A seguir, cada cultura foi inoculada em um Erlenmeyer (2 L) contendo 1 L de meio LB com canamicina 30 µg/mL e incubada a 37 °C (190 rpm). O crescimento das culturas foi monitorado em 600 nm até atingir densidade óptica entre 0,5 e 0,6. Nesse momento, a temperatura de incubação foi reduzida para 18 °C, o agente indutor IPTG foi adicionado ao meio de cultura para concentração final de 0,5 mM e manteve-se a indução da expressão por 6 h. Finalizada a etapa de indução, as células

foram centrifugadas (7000  $\times g$ , 4 °C, 10 min) para retirada do sobrenadante e armazenadas a -20 °C até o momento da lise celular e purificação do inibidor.

Para a lise, amostras de células referentes a 250 mL de meio de cultura foram ressuspensas no tampão Tris-HCl 50 mM com NaCl 300 mM e PMSF 1 mM (pH 8,5) e sonicadas com 8 ciclos de 15 segundos cada, com intervalo de 30 segundos entre cada sonicação. A seguir, o lisado foi centrifugado (16600  $\times g$ , 4 °C, 20 min), para obtenção do precipitado e do sobrenadante, que foram analisados por SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970).

Além disso, precipitado e sobrenadante foram avaliados quanto à sua capacidade de inibição da atividade enzimática da CB-Cdc. Desse modo, a toxina (2  $\mu g$ ) foi pré-incubada (15 min, 37 °C, 300 rpm) com amostras do precipitado e do sobrenadante (10  $\mu L$ ) e, a seguir, procedeu-se incubação com o substrato NOB como já descrito no item 2.3.12.2. Os resultados foram analisados pelo *software* GraphPad Prism 6.01 por *one-way* ANOVA seguido do teste de Dunnett para comparações múltiplas. As amostras foram comparadas ao controle positivo contendo apenas CB-Cdc e os resultados foram expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão, sendo considerados estatisticamente significantes quando  $p < 0,05$ .

Para purificação do inibidor recombinante, o sobrenadante foi submetido a uma cromatografia de afinidade em coluna com resina de níquel (1 mL, Ni-NTA Agarose, QIAGEN). A coluna foi previamente equilibrada com tampão A (NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 50 mM com NaCl 300 mM, pH 8,2) e o inibidor recombinante foi eluído através de um gradiente de imidazol (0-500 mM) nesse mesmo tampão, sendo 5 CV com 0 mM, 4 CV com 25, 50, 100 e 250 mM cada gradiente e 2 CV com 500 mM de imidazol. Para os gradientes de 25-250 mM de imidazol, as frações foram coletadas a cada 2 CV. O lisado celular e as frações da cromatografia foram avaliados por SDS-PAGE 13,5% (LAEMMLI, 1970).

As frações contendo o inibidor foram submetidas a cromatografia de filtração molecular e, em seguida, à cromatografia de fase reversa, como já descrito no item 2.3.7 para o inibidor rCdtPLI2 produzido em *P. pastoris*. O brCdtPLI2 purificado foi submetido ao ensaio de inibição da atividade enzimática da CB-Cdc como descrito no item 2.3.12.2. Para esse ensaio, 1  $\mu g$  de CB-Cdc foi incubado com 1 ou 2  $\mu g$  de brCdtPLI2. CB-Cdc na ausência do inibidor foi considerado o controle positivo.

## **2.4 RESULTADOS E DISCUSSÃO**

### 2.4.1 Escolha do inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub>

Como discutido no capítulo anterior, foram encontrados no transcriptoma da glândula de peçonha de *C. d. terrificus* inibidores de PLA<sub>2</sub> pertencentes às três classes ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) já descritas na literatura. Inibidores da classe  $\alpha$  têm demonstrado interessantes atividades antimiotóxicas locais e inibição de fosfolipases ácidas (NEVES-FERREIRA *et al.*, 2010; OHKURA *et al.*, 1997; SANTOS-FILHO *et al.*, 2016). Já os inibidores da classe gama inibem fosfolipases A<sub>2</sub> tanto ácidas como básicas (OHKURA *et al.*, 1997), mas diversos grupos já têm estudado essa classe de inibidores.

Por sua vez,  $\beta$ -PLIs podem ser mais específicos para fosfolipases básicas (OHKURA *et al.*, 1997), mas poucos estudos sobre eles estão disponíveis na literatura (LIMA *et al.*, 2011; OHKURA *et al.*, 1997; OKUMURA *et al.*, 1998; SHIRAI *et al.*, 2009). Por esse motivo, foi escolhido um  $\beta$ -PLI da glândula de peçonha de *C. d. terrificus* para este estudo, visando sua produção heteróloga, e caracterização bioquímica e funcional, visto que esta molécula possui uma aplicação potencial como adjuvante na terapia do envenenamento por serpentes.

```

CdtPLI2      VLYCPPTPAPESVTEFVCNSPSLREFPTGFPARTKSISVEFTQVSSLGMEALQGLPNLQE 60
CdtPLI3      ALYCPPTPAPESVTEFVCNSPSLREFPTGFPARAKMISVEFTQVSSLGMEALQGLPNLQE 60
. *****: * *****

CdtPLI2      LHLSNNRLKTLPNGLFRNLPQLHTLDLSNNLLEDLPPEIFTNASSLTHLSLSENQLAELR 120
CdtPLI3      LHLSNNRLKTLPNGLFRNLPQLHTLDLSNNLLEDLPPEIFTNASSLTHLSLSENQLAELR 120
*****

CdtPLI2      PSWFESLEKLRILGLDHNQVKEIPISCFDKLEELTSLDLSFNLLHRLAPEMFSGLDNLER 180
CdtPLI3      PSWFESLEKLRILGLDHNQVKEIPISCFDKLEELTSLDLSFNLLHRLAPEMFSGLDNLER 180
*****

CdtPLI2      LVLESNPIQCIVKKTFWHHPKLSVLSLKNSSLTHIIMGVFDPLDQLELLDLSDNELSTMD 240
CdtPLI3      LVLESNPIQCIVKKTFWHHPKLSVLSLKNSSLTHIIMGVFDPLDQLELLDLSDNELSTMD 240
*****

CdtPLI2      DPVYKPSANLSLDLSGNRWACDCRLENLLRWIKDHNHLYSKEEFVCASPKHFKGERATS 300
CdtPLI3      DPVYKPSANLSLDLSGNRWACDCRLENLLRWIKDHNHLYSKEEFVCASPKHFKGEHATS 300
*****:***

CdtPLI2      LQTYQICPC 309
CdtPLI3      LQTYQICPC 309
*****

```

**Figura 2.7** – Alinhamento entre as sequências dos  $\beta$ -PLIs CdtPLI2 e CdtPLI3. O alinhamento foi gerado pelo servidor *Clustal Omega* (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Resíduos não conservados estão em vermelho e os resíduos conservados de cisteína estão destacados em amarelo.

As sequências dos  $\beta$ -PLIs CdtPLI2 e CdtPLI3 encontradas no transcriptoma (Figura 2.7) apresentam abundância de 0,025% em termos de TPM. Além disso, são muito similares entre si, apresentando 98,7% de identidade e massa molecular e ponto isoelétrico (pI) teóricos de

35,0 kDa e 5,2, respectivamente. As diferenças entre eles estão localizadas nos resíduos 1, 34, 36 e 297 (Figura 2.7), sendo a mais significativa na posição 297, em que a presença de uma arginina (em CdtPLI2) poderia facilitar processos de digestão na região C-terminal da proteína por proteases específicas caso fossem necessárias sua utilização em ensaios de espectrometria de massas. Portanto, a sequência CdtPLI2 foi a escolhida para o desenvolvimento deste estudo.

#### 2.4.2 *P. pastoris* linhagem KM71H

Existem diversas linhagens de *P. pastoris* disponíveis para utilização em expressão heteróloga de proteínas, como, por exemplo, as linhagens GS115 e KM71H (INVITROGEN, 2010). A *P. pastoris* é uma levedura metilotrófica, ou seja, utiliza metanol como fonte de carbono. Isso ocorre porque essa levedura apresenta dois genes que codificam álcool oxigenases: o gene AOX2, que codifica uma álcool oxigenase (álcool oxigenase 2) basal para sobrevivência da levedura, e o gene AOX1, que codifica uma álcool oxigenase mais ativa e eficiente (álcool oxigenase 1, AOX1), que é traduzido após indução da expressão na presença de metanol (AHMAD *et al.*, 2014; CEREGHINO; CREGG, 2000; INVITROGEN, 2010).

A linhagem KM71H apresenta o fenótipo Mut<sup>s</sup> (s = *slow*), pois o gene da enzima AOX1 está corrompido, sendo a levedura capaz de produzir apenas a AOX2 para sobrevivência da célula em baixas concentrações de metanol devido à lenta metabolização desse álcool (INVITROGEN, 2010). Esse gene é corrompido pela integração do vetor de expressão contendo o gene de interesse através de recombinação homóloga no genoma da *Pichia*. Portanto, a proteína de interesse tem sua expressão induzida na presença de metanol pela indução do promotor do gene AOX1, que é um promotor forte (DALY; HEARN, 2005).

#### 2.4.3 Otimização dos códons para desenho do gene sintético

A otimização dos códons foi realizada uma vez que, após a análise de códons raros, verificou-se que o índice de adaptação de códons (CAI, do inglês, *codon adaptation index*) foi inferior (0,65) ao valor considerado ideal (0,8-1,0) (<https://www.genscript.com/tools/rare-codon-analysis>). Esse índice utiliza um conjunto de genes altamente expressos de uma determinada espécie para avaliar as contribuições relativas de cada códon e calcula um *score* para um gene com base na frequência de uso de todos os seus códons. Uma das aplicações desse

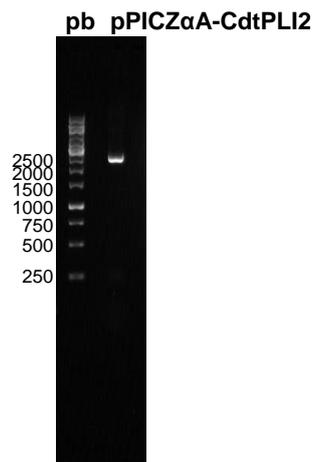
índice é dar uma indicação aproximada do provável sucesso (ou não) da expressão de um gene heterólogo. Quanto menor o valor de CAI, maior é a possibilidade de o gene ser pobremente expresso (SHARP; LI, 1987).

A otimização de códons não altera a identidade do produto codificado pelo gene, mas introduz mutações sinônimas gerando códons ótimos para o organismo que produzirá a proteína de interesse. A presença de códons não ótimos pode favorecer a degradação do RNAm e também pode fazer com que a tradução da proteína seja realizada em uma velocidade mais lenta (PRESNYAK *et al.*, 2015). Os códons raros podem atrapalhar a expressão de uma proteína em organismos unicelulares porque, quanto mais um códon é utilizado por uma espécie, maior a abundância do RNA transportador para o aminoácido por ele codificado, favorecendo a expressão da proteína (QUAX *et al.*, 2015).

Além disso, a presença de códons não ótimos também pode influenciar a estrutura tridimensional de uma proteína (FU *et al.*, 2016; ZHOU *et al.*, 2015). Códons mais frequentemente utilizados aceleram o alongamento da cadeia polipeptídica durante a tradução (enquanto códons não ótimos desaceleram esse processo) e as mudanças nessas taxas de alongamento estão intimamente relacionadas à estrutura proteica para facilitar o seu enovelamento simultâneo à tradução (FU *et al.*, 2016).

#### **2.4.4 Propagação do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 em *E. coli* DH5 $\alpha$**

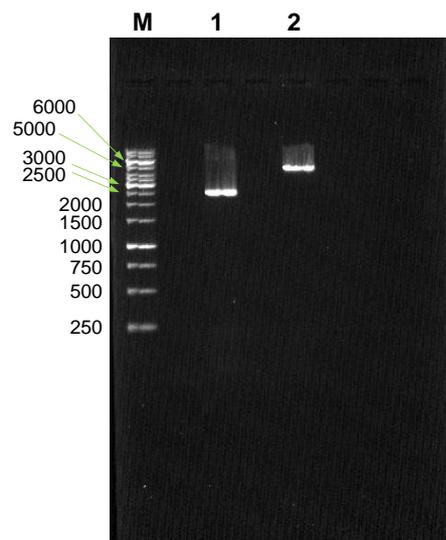
Foram recebidos 4  $\mu$ g do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 produzido pela empresa GenScript. Como o vetor pPICZ $\alpha$ A apresenta uma origem de replicação bacteriana (pUC ori) (INVITROGEN, 2010), células de *E. coli* DH5 $\alpha$  quimiocompetentes foram transformadas com esse vetor e inoculadas em uma placa contendo meio de cultura LB *low salt* adicionado do antibiótico zeocina. As células transformadas apresentam o gene de resistência a zeocina e crescem em meio contendo o antibiótico. No dia seguinte, uma colônia da placa foi transferida para o meio de cultura LB líquido com zeocina para multiplicação das células e, conseqüentemente, do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2. O vetor foi extraído e purificado com sucesso como observado na eletroforese em gel de agarose do material após sua purificação (Figura 2.8). No total, foram obtidos 23,67  $\mu$ g do vetor de expressão.



**Figura 2.8 – Transformação da *E. coli* DH5 $\alpha$  para propagação do plasmídeo recombinante pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2.** Eletroforese em gel de agarose 1% com DNA extraído de 1 colônia transformada. A corrida foi realizada sob voltagem constante de 90 V. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) foi usado como padrão de pares de bases. Abreviação: pb: pares de base.

#### 2.4.5 Linearização do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 e transformação da linhagem KM71H de *P. pastoris*

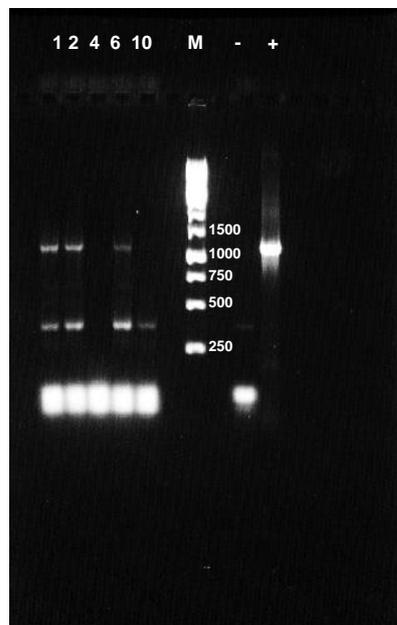
O vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 foi linearizado através da digestão com a enzima PmeI (Figura 2.9), que cliva o vetor de expressão no sítio GTTT↓AAAC (BLOCH; GROSSMANN, 2001). A partir da figura 2.9, observa-se que o tamanho do vetor digerido corresponde ao valor esperado de, aproximadamente, 3,6 kpb.



**Figura 2.9 – Linearização do vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2 através da digestão com PmeI.** A digestão foi avaliada eletroforese em gel de agarose 1% sob voltagem constante de 90 V. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) foi usado como padrão de pares de bases. As bandas de DNA são visualizadas pela incorporação de GelRed™ ao gel de agarose e as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation. Poços: M: marcador de pares de bases; 1: vetor purificado após propagação em *E. coli* e não digerido; 2: vetor purificado após propagação em *E. coli* e digerido com PmeI.

O vetor na sua forma circular não apresenta uma correspondência com seu tamanho real em pares de bases no gel de agarose, pois é uma estrutura fechada muito compacta (*super coil*), que migra mais facilmente na malha do gel do que sua forma linearizada (ISHIDO; ISHIKAWA; HIRANO, 2010), na qual as extremidades do vetor ficam livres para dissipar a torção do *super coil*. Como os padrões de pares de bases no gel de agarose são compostos por DNA linearizados (THERMO SCIENTIFIC, 2018), a estimativa do tamanho só pode ser feita após a linearização do vetor de interesse. Após a linearização e purificação, foi obtido um rendimento final de 2,14 µg do vetor pPICZαA-CdtPLI2 linearizado.

O vetor linearizado foi utilizado para transformar células de *P. pastoris* da linhagem KM71H posteriormente semeadas em uma placa de YPDS ágar com zeocina 500 µg/mL. As células tiveram um bom crescimento durante as primeiras 48 h de incubação e 10 colônias isoladas foram selecionadas dos quatro quadrantes da placa para realizar o PCR de colônia e confirmar a presença do gene do rCdtPLI2. Para isso, cada colônia foi inoculada em YPD com zeocina 500 µg/mL e observou-se crescimento das colônias 1, 2, 4, 6 e 10, que foram, então, submetidas ao ensaio de PCR. As colônias 1, 2 e 6 mostraram resultado positivo para a presença do gene do rCdtPLI2 (Figura 2.10).



**Figura 2.10 – Seleção das colônias transformadas de *P. pastoris* KM71H.** PCR de colônia com as 5 colônias (1, 2, 4, 6 e 10) selecionadas da placa com zeocina 500 µg/mL que, posteriormente, cresceram em YPD. Nos poços estão indicados os números das colônias analisadas. Controle positivo (+) realizado com o vetor pPICZαA-CdtPLI2 purificado após propagação em *E. coli* DH5α. Controle negativo representado por “-”. A eletroforese em gel de agarose 1% ocorreu sob voltagem constante de 90 V. As bandas de DNA são visualizadas pela incorporação de GelRed™ ao gel de agarose e as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation. **Abreviação:** M: marcador de pares de bases.

#### 2.4.6 Seleção de colônias multicópias após transformação

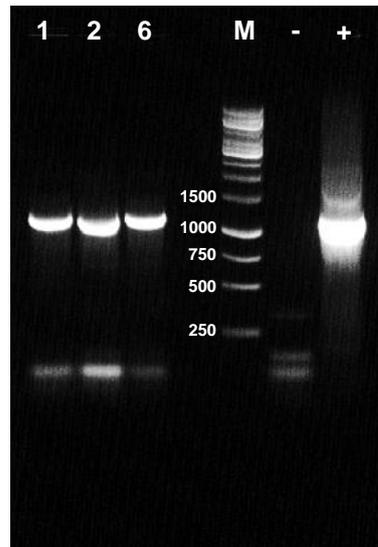
Na etapa de transformação da *P. pastoris* com o vetor de expressão, o gene de interesse é integrado ao genoma da levedura através de recombinação homóloga, na qual o promotor AOX1 e a região do 3'-AOX1 facilitam a substituição do *locus* AOX1 cromossômico pelo *cassette* de expressão através de um *crossing over* duplo e, após a recombinação homóloga, o *cassette* de expressão está estavelmente integrado ao genoma (SCHWARZHANS *et al.*, 2016). Adicionalmente, o *cassette* de expressão é inserido antes ou depois do *locus* AOX1, via *crossover* único, diversas vezes levando a integrações sequenciais (SCHWARZHANS *et al.*, 2016) e gerando colônias multicópias.

Alguns métodos foram desenvolvidos para aumentar o número de cópias de um vetor. O primeiro envolve realizar múltiplas transformações da levedura utilizando um vetor com diferentes marcadores de seleção e um marcador para cada transformação sequencial, mas o número de cópias do gene está limitado ao número de marcadores utilizados (LIN CEREGHINO *et al.*, 2001). Um segundo método baseia-se no fato de que o produto de um gene marcador de seleção é geralmente sensível à concentração do marcador no meio de cultura. Portanto, células transformadas que são resistentes a altos níveis de antibiótico, normalmente, contém um número maior de cópias do vetor, mas apenas um pequeno número das colônias resistentes é resultado de um aumento no número de cópias do vetor (ROMANOS *et al.*, 1998). Um terceiro método, e que foi realizado neste trabalho, consiste em inocular sequencialmente células transformadas de *P. pastoris* em meios de cultura com níveis crescentes do marcador de seleção (SUNGA; TOLSTORUKOV; CREGG, 2008).

As colônias 1, 2 e 6 foram inoculadas sequencialmente em YPD ágar com concentrações crescentes de zeocina (500, 1000 e 2000 µg/mL) e, posteriormente, foram submetidas novamente ao ensaio de PCR para confirmação da presença do gene do rCdtPLI2. Todas elas continuaram positivas para o gene de interesse (Figura 2.11) e foram, portanto, selecionadas para proceder uma avaliação da expressão do inibidor em escala laboratorial pequena.

Diferentes eventos de integração podem ser observados/preditos em *P. pastoris* (SCHWARZHANS *et al.*, 2016). Os mais comuns são a recombinação homóloga no *locus* AOX1 durante a transformação da levedura e o *crossover* único, que leva à geração de colônias multicópias, que já foram discutidos anteriormente. Além desses, também podem ocorrer a

integração do vetor completo devido a digestão incompleta ou re-anelamento *in vivo* e a substituição da região após o AOX1 apenas pelo gene do marcador de seleção (SCHWARZHANS *et al.*, 2016). Este último, levando à perda do gene de interesse, mas conferindo resistência à colônia. Portanto, a colônia seria capaz de crescer em alta concentração de zeocina, mas apresentaria um resultado negativo ao realizar o PCR de colônia.



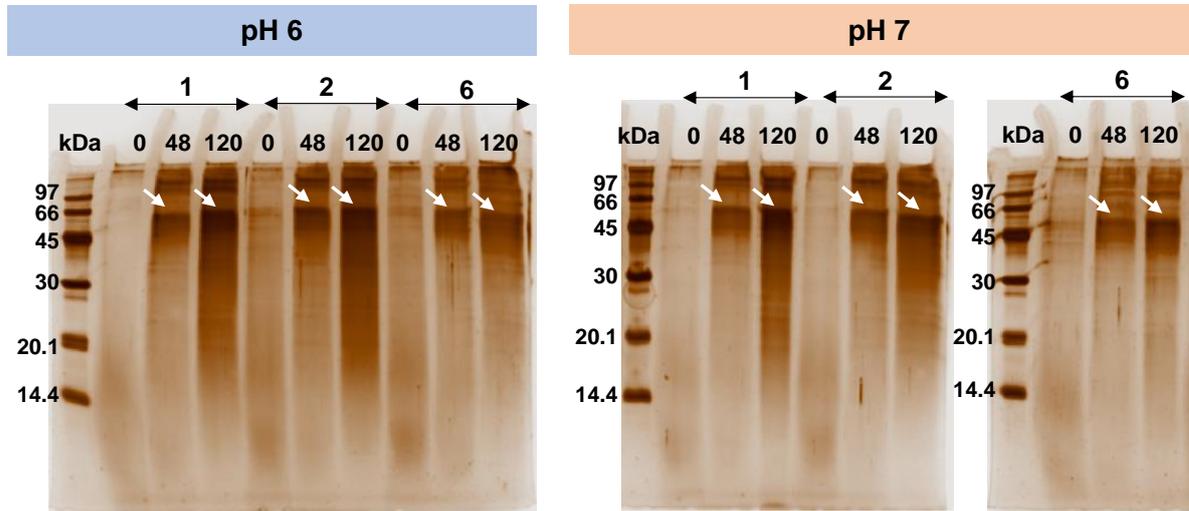
**Figura 2.11 – Confirmação, através de PCR, da presença do gene do rCdtPLI2 nas colônias transformadas de *P. pastoris* KM71H super-resistentes à zeocina.** Nos poços estão indicados os números das colônias analisadas (1, 2 e 6). Controle positivo (+) realizado com o vetor pPICZαA-CdtPLI2 purificado após propagação em *E. coli* DH5α. Controle negativo representado por “-”. A eletroforese em gel de agarose 1% ocorreu sob voltagem constante de 90 V. As bandas de DNA são visualizadas pela incorporação de GelRed™ ao gel de agarose e as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation. **Abreviação:** M: marcador de pares de bases.

#### 2.4.7 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 em placa *deep-well*

As colônias 1, 2 e 6 foram submetidas a ensaios de expressão do rCdrPLI2 em placa *deep-well* (em pH 6 ou 7), sendo a indução da expressão por metanol durante o período de 120 h. Nos tempos zero, 48 e 120 h foram colhidas amostras dos sobrenadantes das culturas para avaliação da expressão por SDS-PAGE (Figura 2.12).

Para todas as colônias e em ambos os valores de pH, observa-se o aparecimento de uma banda possivelmente do rCdtPLI2 em ~45 kDa com o decorrer da indução da expressão (Figura 2.12). Essa banda apresenta massa molecular de ~9 kDa acima da massa molecular teórica do inibidor (~36 kDa) condizente com a presença de glicosilações realizadas pela *P. pastoris*. Em seguida, as três colônias foram submetidas a uma avaliação da expressão do rCdtPLI2 em escala

laboratorial pequena, na qual obtém-se um volume adequado de sobrenadante de cultura ao final da expressão que pode ser utilizado para a purificação do inibidor recombinante.



**Figura 2.12 – Avaliação da expressão do rCdtPLI2 pelas colônias crescidas em YPD ágar com zeocina 2000  $\mu\text{g/mL}$ .** A expressão do inibidor foi realizada em pH 6 e 7 e avaliada por SDS-PAGE 13,5% na voltagem constante de 125 V. As bandas de proteínas foram coradas através da metodologia de coloração por prata, mas as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e coloridas artificialmente pelo *software* Image Lab™. Em cada poço está indicado o tempo de indução em que o sobrenadante da cultura foi colhido para verificar a produção do inibidor (indicado pela seta).

Valores ácidos de pH, geralmente, causam a diminuição da ação de enzimas proteolíticas durante a expressão de proteínas recombinantes (YU *et al.*, 2014). Entretanto, no caso do rCdtPLI2 aparentemente há maior predomínio de bandas de baixa massa molecular em pH 6, que podem ter sido geradas devido a ação enzimática de proteases da *P. pastoris*. Aliado a isso, o pH 6 está muito próximo do pI do rCdtPLI2, o que poderia facilitar a agregação do inibidor. A expressão do inibidor também foi realizada na presença de casaminoácidos 1,5%. Os casaminoácidos são provenientes da hidrólise ácida de caseína e têm sido utilizados para reduzir a taxa de proteólise de proteínas recombinantes (CLARE *et al.*, 1991; CORDEIRO, 2017). Sendo assim, a expressão do rCdtPLI2 continuará sendo realizada em pH 7 e na presença de casaminoácidos 1,5%.

#### 2.4.8 Avaliação da expressão do rCdtPLI2 pelas colônias 1, 2 e 6 em escala laboratorial pequena

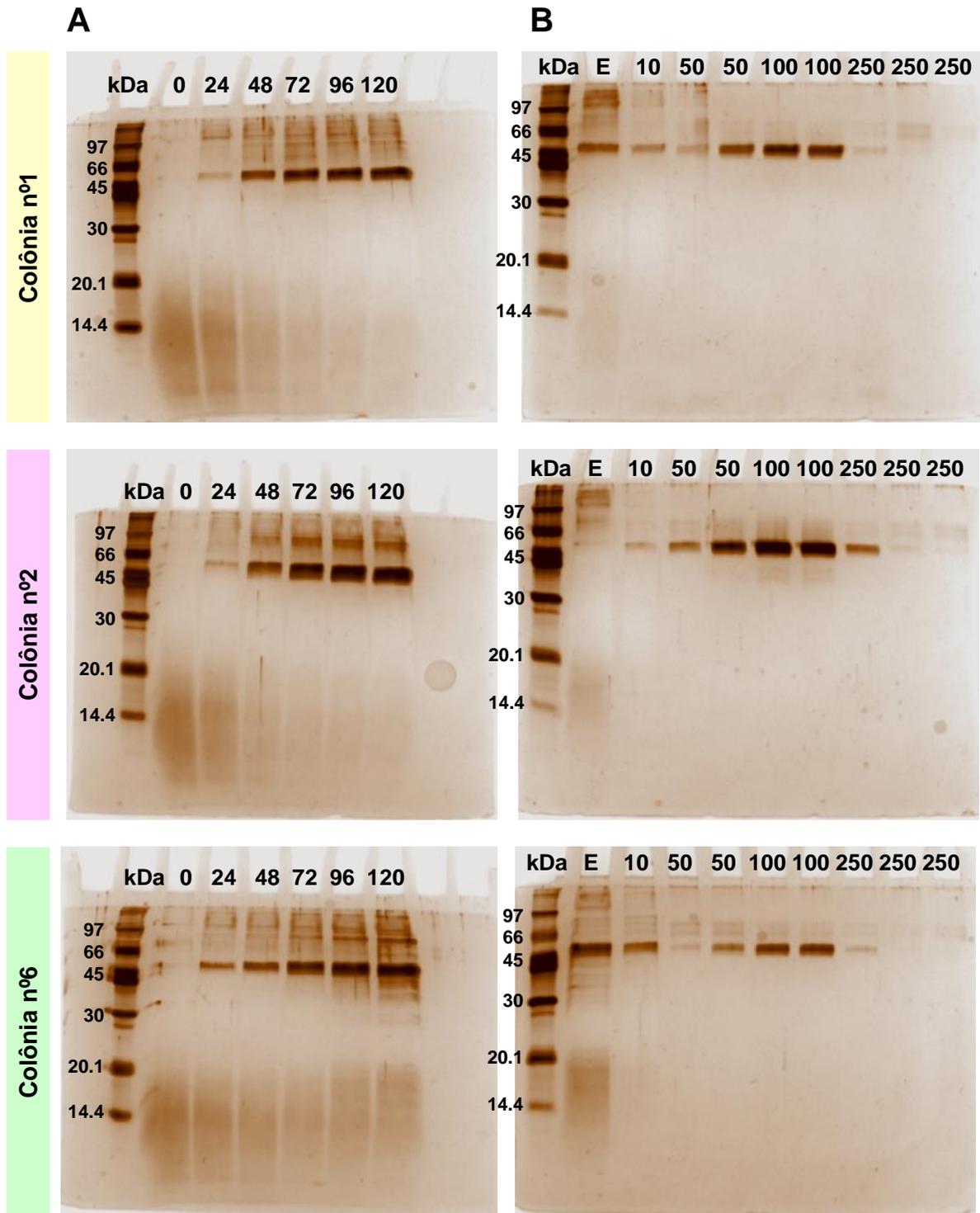
Na expressão do rCdtPLI2 pelas colônias 1, 2 e 6 em escala laboratorial pequena, as densidades de células obtidas durante a etapa de geração de biomassa foram muito similares,

como verificado pelas absorvâncias das culturas em 600 nm: 8,05 para a colônia 1; 8,01 para a colônia 2 e 7,49 para a colônia 6. A indução da expressão foi realizada em pH 7 com casaminoácidos 1,5%.

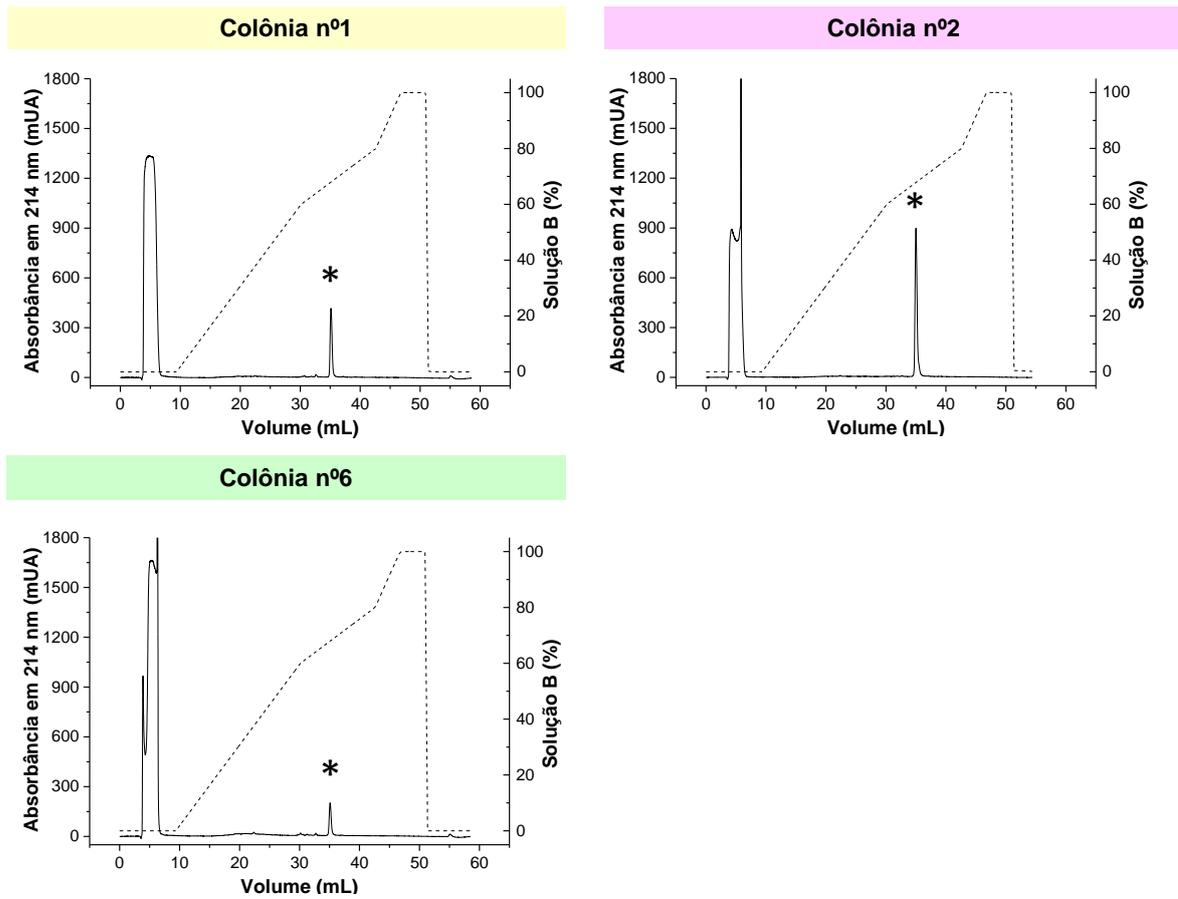
Para todas as colônias, observa-se forte banda do rCdtPLI2 em ~45 kDa com aumento gradual ao longo das 120 h de indução (Figura 2.13A). A massa molecular teórica do rCdtPLI2 é de 36.7 kDa. Uma vez que o sistema de expressão em *P. pastoris* é um sistema eucariótico capaz de realizar modificações pós-traducionais nas proteínas produzidas, é muito provável que a diferença de, aproximadamente, 8.3 kDa entre a massa teórica e a massa estimada por eletroforese seja devido à presença de N/O-glicosilações no rCdtPLI2. No entanto, para colônia nº 6, também são observadas bandas entre 30-45 kDa com 120 h, que podem ser devidas à presença do inibidor com diferentes padrões de glicosilação ou ainda devidas à degradação da proteína recombinante.

Os três sobrenadantes das culturas foram fracionados por cromatografia em resina de níquel para purificação do inibidor que interage com a resina através de sua a His-tag N-terminal (Figura 2.13B). Para todas as colônias, o inibidor foi eluído entre 10-250 mM de imidazol. Sendo que bandas mais intensas para as colônias indicam maior produção da proteína recombinante. Para as colônias 1 e 6, observa-se banda no efluente com ~45 kDa (não vista para a colônia 2), possivelmente representando alguma proteína celular da *P. pastoris* ou o inibidor clivado por proteases celulares (Fig. 2.13B). As frações entre 50-250 mM foram reunidas, dialisadas em uma membrana com exclusão de 10 kDa e lavadas com Tris-HCl 50 mM (pH 8), para retirada do imidazol proveniente da cromatografia de afinidade. O gradiente com 10 mM não foi utilizado pois possivelmente contém proteínas que interagem de forma inespecífica com a resina de níquel e são lavadas logo no início da cromatografia. As frações concentradas foram submetidas à cromatografia de fase reversa em coluna C4 (Figura 2.14).

Para as três colônias, observa-se larga banda que não interage com a resina provavelmente devido à presença dos sais do tampão e uma banda única referente ao inibidor eluída no gradiente de acetonitrila, sendo de maior proporção para a colônia nº 2, que obteve maior área de pico. Os valores de área foram 165,6743 mUA\*mL para a colônia nº1, 381,4156 mUA\*mL para a colônia nº2 e 90,2646 mUA\*mL para a colônia nº 6. Portanto, levando em consideração todos esses resultados de expressão e purificação, escolheu-se a colônia nº 2 para a expressão do rCdtPLI2.



**Figura 2.13 – Expressão do rCdtPLI2 pelas colônias 1, 2 e 6 e purificação do sobrenadante por cromatografia de afinidade.** A expressão do inibidor e sua purificação foram avaliados por SDS-PAGE 13,5% na voltagem constante de 110 V. As bandas de proteínas foram coradas através da metodologia de coloração por prata, mas as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e coloridas artificialmente pelo *software* Image Lab™. **A)** A cada 24 h foi recolhido sobrenadante das culturas para verificar a produção do rCdtPLI2. **B)** Após 120 h de indução da expressão, o sobrenadante da cultura foi fracionado através de cromatografia de afinidade em resina de níquel para separação do rCdtPLI2. Em cada poço está a concentração de imidazol na qual a fração foi eluída. **Abreviações:** E: efluente da coluna durante aplicação do sobrenadante da cultura.



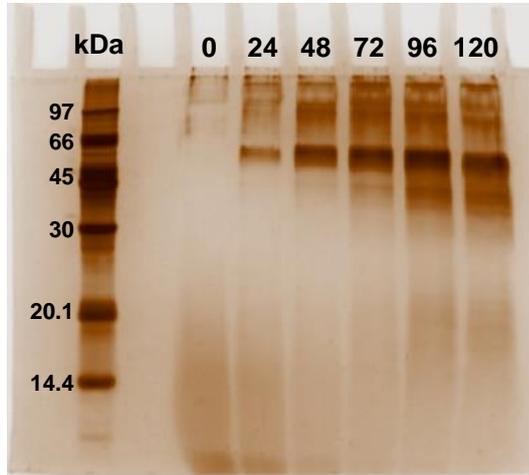
**Figura 2.14 – Cromatografia de fase reversa das frações de cromatografia de afinidade contendo o rCdtPLI2 expresso pelas colônias 1, 2 e 6 em escala laboratorial pequena.** As frações foram aplicadas na coluna Jupiter® 5 $\mu$  C4 300 Å (250 x 4,6 mm, Phenomenex) previamente equilibrada com TFA 0,1% e a eluição das amostras seguiu um gradiente de ACN (0-80%) em TFA 0,1% monitorada pelo sistema Äkta pure (GE Healthcare) em 214 nm. Os picos referentes ao rCdtPLI2 são indicados por um \*.

#### 2.4.9 Expressão do rCdtPLI2 pela colônia nº 2 em escala laboratorial

A expressão do rCdtPLI2 pela colônia nº 2 foi realizada em escala laboratorial com 120 h de indução na presença de metanol. A indução da expressão foi realizada em pH 7 na presença de casaminoácidos 1,5%. Observa-se ao longo do tempo o aparecimento de uma banda de proteína entre 45-66 kDa relativo à presença do inibidor expresso (Figura 2.15).

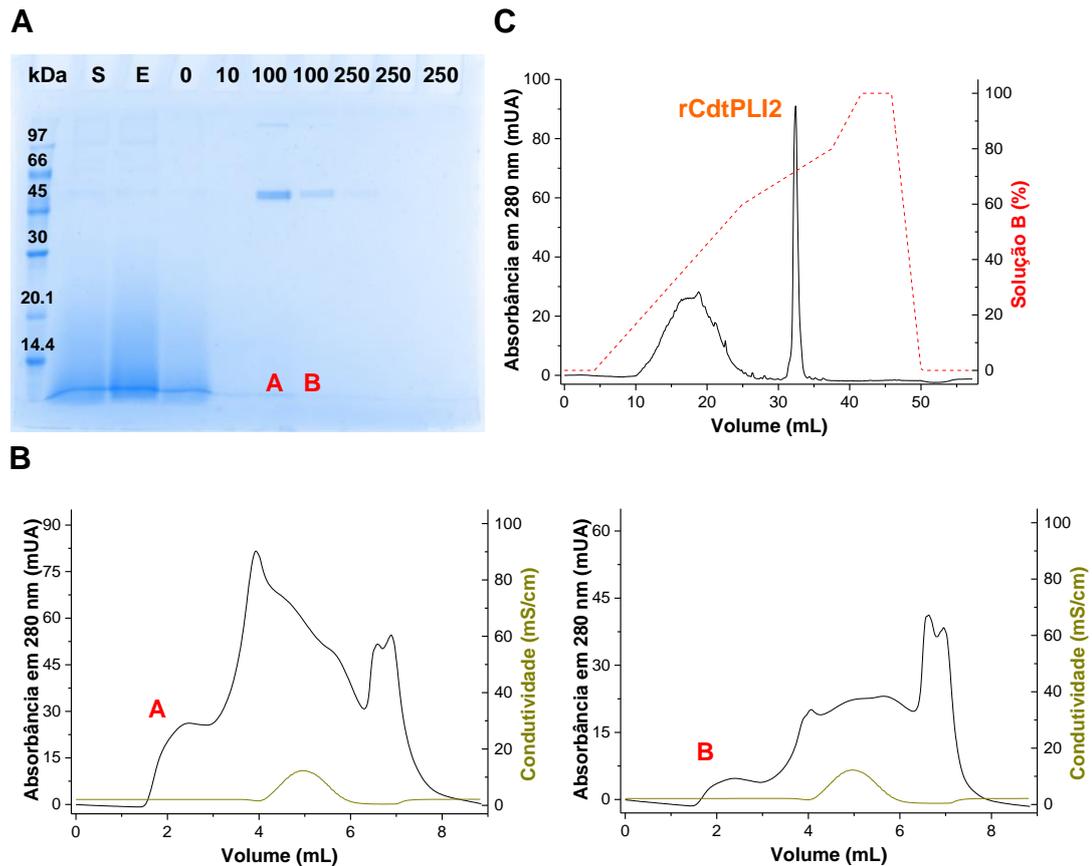
O inibidor foi isolado do sobrenadante da cultura celular através de três etapas cromatográficas: afinidade, filtração molecular e fase reversa. Na cromatografia de afinidade, o sobrenadante da cultura foi aplicado em uma coluna com resina de níquel e o inibidor foi eluído nas frações do gradiente com 100 mM de imidazol (Figura 2.16A). A seguir, essas frações foram reunidas e dessalinizadas em uma coluna de filtração molecular equilibrada com solução de TFA 0,05% (Figura 2.16B), para posterior fracionamento através da cromatografia

de fase reversa (Figura 2.16C). Na expressão e purificação apresentadas, foram realizadas 14 cromatografias de filtração molecular cujas frações eluídas foram reunidas e aplicadas em uma única cromatografia de fase reversa, que deu origem a um pico com área de 73,5531 mUA\*mL referente ao rCdtPLI2 (Figura 2.16C).



**Figura 2.15 – Indução da expressão do rCdtPLI2 pela colônia 2 em escala laboratorial.** A expressão foi avaliada por SDS-PAGE 13,5% na voltagem constante de 110 V. As bandas de proteínas foram coradas através da metodologia de coloração por prata, mas as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e coloridas artificialmente pelo *software* Image Lab™. A cada 24 h foi recolhido sobrenadante das culturas para verificar a produção do rCdtPLI2.

O rendimento de rCdtPLI2 expresso foi de  $\sim 2,4 \mu\text{g rCdtPLI2/mL}$  de cultura. Embora esse rendimento tenha sido um dos mais altos obtidos ao longo do desenvolvimento desse trabalho (sendo possível até mesmo a visualização da proteína com coloração por *Coomassie*® (Figura 2.16A), o valor obtido ainda está inferior ao observado para outras proteínas expressas em *P. pastoris*, em geral, na ordem de grama de proteína expressa/mL de cultura (INVITROGEN, 2010). No entanto, ao se analisar detalhadamente o tipo de linhagem utilizada para a produção da proteína, observa-se que as proteínas produzidas por linhagem Mut<sup>s</sup> e secretadas no meio de cultura, como é o caso do rCdtPLI2, normalmente têm um rendimento menor na ordem de mg/mL (INVITROGEN, 2010). Como exemplos, podem ser citados o inibidor de protease carboxipeptidase B com rendimento de 0,8 mg/mL e outras proteínas com rendimento menor ainda: a porção solúvel do CD38 humano rendendo 50  $\mu\text{g/mL}$  e a pectato liase com rendimento de 4  $\mu\text{g/mL}$  (DESPREAUX; MANNING, 1993; FRYXELL *et al.*, 1995; GUO; GONZÁLEZ-CANDELAS; KOLATTUKUDY, 1995; INVITROGEN, 2010).



**Figura 2.16 – Purificação do rCdtPLI2.** **A)** Perfil eletroforético das frações obtidas da cromatografia de afinidade em resina de níquel do sobrenadante da cultura em SDS-PAGE 13,5% na voltagem constante de 120 V. As bandas de proteínas foram coradas com *Coomassie® Brilliant Blue G-250*, mas as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e coloridas artificialmente pelo *software* Image Lab™. Em cada poço está a concentração de imidazol na qual a fração foi eluída. **Abreviações:** E: efluente da coluna durante aplicação do sobrenadante da cultura; S: sobrenadante após 120 h de indução da expressão. **B)** Filtração molecular na coluna *HiTrap™ Desalting* (5 mL, GE Healthcare) das frações A e B (100 mM de imidazol) da cromatografia de afinidade contendo o rCdtPLI2. A coluna foi previamente equilibrada com TFA 0,05% e o inibidor eluído nessa mesma solução. **C)** Cromatografia de fase reversa das frações (A e B) dessalinizadas e reunidas contendo o rCdtPLI2. A fração foi aplicada na coluna Jupiter® 5µ C4 300 Å (250 x 4,6 mm, Phenomenex) previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição das frações seguiu um gradiente de ACN (0-80%) em TFA 0,1%. As Etapas **B)** e **C)** foram monitoradas pelo sistema Äkta purifier UPC-10 (GE Healthcare) em 280 nm.

#### 2.4.10 Confirmação da expressão do inibidor

A fração eluída no gradiente de acetonitrila (~70% da solução B) da cromatografia de fase reversa em coluna C4 (Figura 2.16C) foi submetida ao sequenciamento N-terminal por degradação de Edman, no qual obteve-se os 20 primeiros resíduos de aminoácidos:

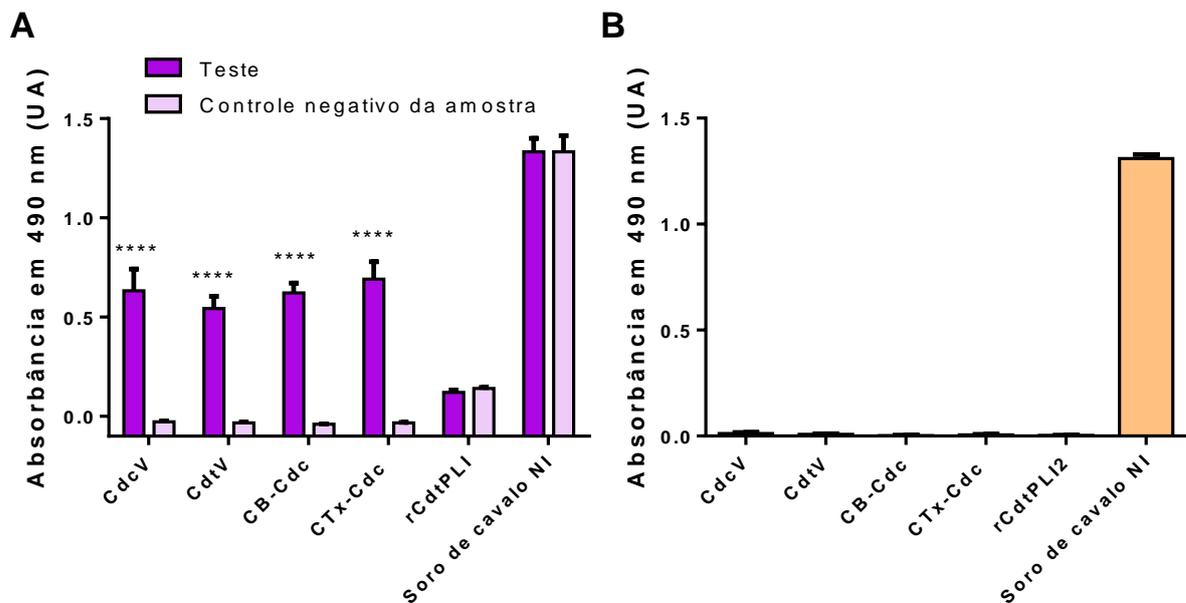


Esses resíduos correspondem à *His-tag* (1-6), ao sítio de clivagem da protease TEV (7-13) e ao N-terminal do inibidor rCdtPLI2 (14-20), confirmando sua expressão em *P. pastoris*.

### 2.4.11 Reconhecimento do rCdtPLI2 pelo soro anticrotálico comercial e predição de epítomos lineares de células B

Embora se tenha estudado melhorias na produção do soro antiofídico (LAUSTSEN, 2018; LUIZ *et al.*, 2018; SILVA *et al.*, 2018), ele ainda é atualmente produzido de modo muito similar ao desenvolvido há mais de um século. São realizadas hiperimunizações de cavalos com amostras de peçonha e seus soros são extraídos para purificação das imunoglobulinas que farão parte do antiveneno (THEAKSTON; WARRELL; GRIFFITHS, 2003).

Uma vez que o principal objetivo deste estudo é investigar o potencial do rCdtPLI2 como um complemento na terapia do envenenamento e a interação antígeno-anticorpo pode levar à neutralização do antígeno, foi avaliado se esse inibidor seria capaz de ser reconhecido pelo soro anticrotálico comercial (Figura 2.17A).



**Figura 2.17 – Reconhecimento do rCdtPLI2 pelo soro anticrotálico comercial.** Os poços da microplaca foram sensibilizados com 2  $\mu$ g do rCdtPLI2, peçonha de *C. d. collilineatus* (CdcV), peçonha de *C. d. terrificus* (CdtV), crotoxina de *C. d. collilineatus* (CTx-Cdc) e a cadeia básica da crotoxina de *C. d. collilineatus* (CB-Cdc) e 2  $\mu$ L de soro de cavalo NI (não imunizado). **A)** Para o teste da amostra, foi utilizado como anticorpo primário o soro anticrotálico comercial (1:100) para avaliar a capacidade de reconhecimento do rCdtPLI2 e anticorpos policlonais anti-cavalo marcados com peroxidase (1:3000) como anticorpo secundário. Para o controle negativo da amostra, o soro anticrotálico comercial foi substituído por soro de cavalo não-imunizado. **B)** O anticorpo primário foi substituído por MPBS 1%. O ensaio foi realizado em quadruplicata e a absorbância das amostras foi lida em 490 nm. Os resultados estão representados pela média  $\pm$  o desvio padrão, analisados por ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni. \*\*\*\* $p < 0,0001$  quando amostras comparadas ao seu respectivo controle negativo e ##### $p < 0,0001$  quando amostras comparadas ao controle negativo do experimento.

A crotoxina (CTx-Cdc) e seu componente básico (CB-Cdc) foram reconhecidos tão bem quando as peçonhas brutas de *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* (Figura 2.17A), o que é um

reflexo da grande proporção desses componentes em peçonhas crotálicas. No proteoma de *C. d. collilineatus*, podem ser encontrados até 88% de PLA<sub>2</sub> enquanto essa proporção pode ser estimada em até 90% na peçonha de *C. d. terrificus*, como verificado por outros pesquisadores e também no Capítulo 1 deste trabalho (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; CALVETE *et al.*, 2010; GEORGIEVA *et al.*, 2010; MELANI *et al.*, 2015; OLIVEIRA *et al.*, 2019).

O inibidor rCdtPLI2 não apresentou diferença significativa em relação ao seu controle negativo (Figura 2.17A), indicando que o soro não neutraliza o inibidor, o que é desejável em um possível uso do rCdtPLI2 associado à soroterapia. Adicionalmente, o anticorpo secundário não é capaz de reconhecer as amostras de forma inespecífica (Figura 2.17B), reconhecendo apenas a amostra de soro de cavalo não imunizado (controle positivo do experimento). Esses resultados corroboram a predição *in silico* de epítomos contínuos/lineares de célula B (Figura 2.18), na qual apenas 1 potencial epítomo foi identificado na porção N-terminal, compreendendo o sítio de clivagem da protease TEV e parte do N-terminal da sequência do inibidor.

```

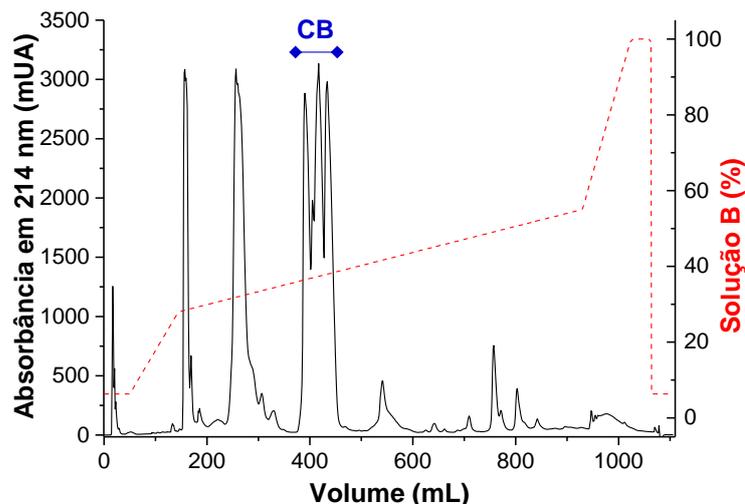
HHHHHHENLYFQGVLYCPPTPAPESVTEFVCNSPSLREFPTGFPPARTKSI SVEFTQVSSLGMEALQ
-----LYFQGVLYCPPTPA-----
GLPNLQELHLSNNRLKTLPNGLFRNLPQLHTLDLSNNLLEDLPPEIFTNASSLTHLSLSENQLAEL
-----
RPSWFESLEKLRILGLDHNQVKEIPI SCFDKLEELTSLDLSFNLLHRLAPEMFSGLDNLERLVLES
-----
NPIQCI VKKTFHWHPKLSVLSLKNSSLTHI IMGVFDPLDQLELLDLSDNELSTMDDPVYKPSANLS
-----
LDLSGNRWACDCRLENLLRWIKDHNHLYSKEEFVCASPKHFKGERATSLQTYQICPC322
-----
    
```

**Figura 2.18 – Predição de epítomos lineares de células B no rCdtPLI2.** A predição foi realizada pelo servidor ABCpred (SAHA; RAGHAVA, 2006). A His-tag N-terminal está em negrito e o sítio de clivagem da protease TEV está em vermelho. O epítomo predito está em azul.

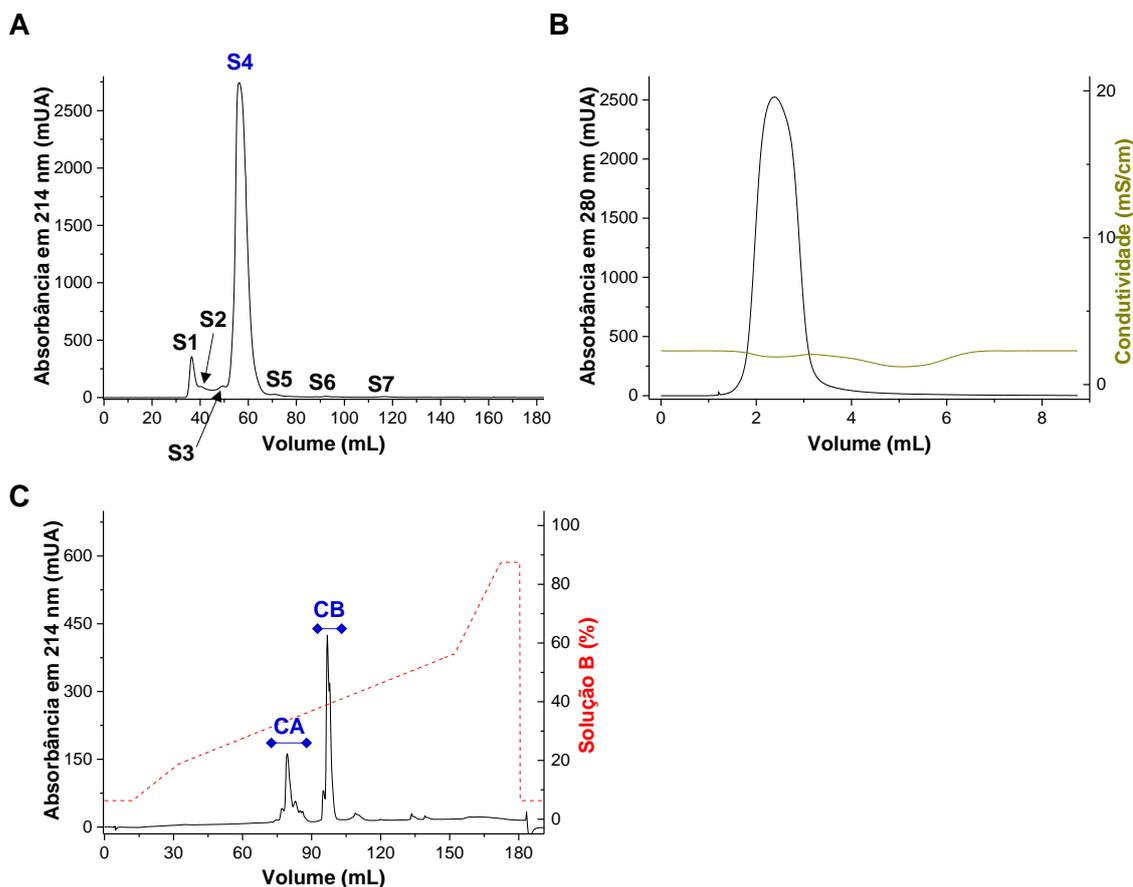
Além disso, ao analisar a sequência de aminoácidos do inibidor natural (sem a His-tag e o sítio de clivagem), nenhum epítomo foi predito, sugerindo, portanto, baixa tendência em apresentar imunogenicidade. No entanto, também podem existir epítomos conformacionais que são estudados a partir da estrutura tridimensional das proteínas (HASTE ANDERSEN; NIELSEN; LUND, 2006) e, até o momento, tal estudo não é possível para o rCdtPLI2.

#### 2.4.12 Inibição de atividade fosfolipásica pelo rCdtPLI2 glicosilado

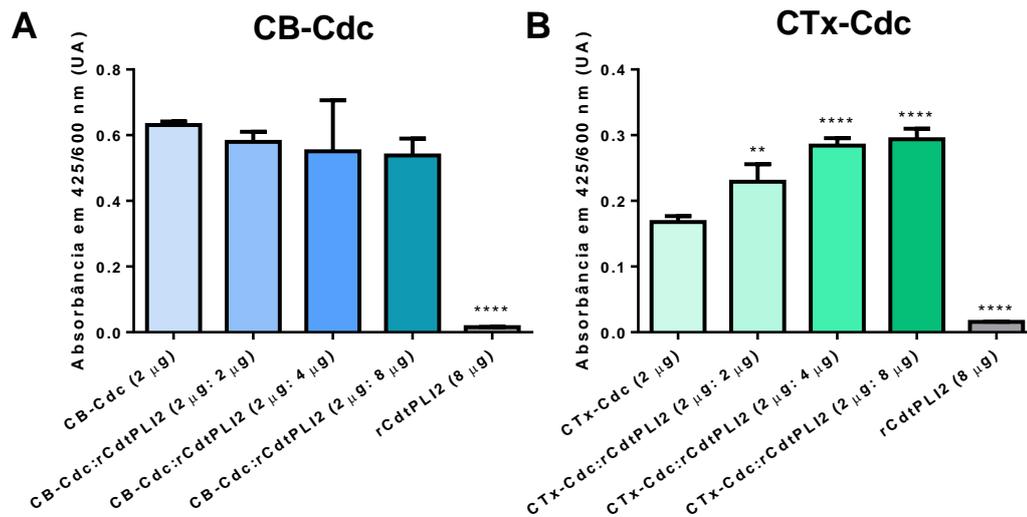
As figuras 2.19 e 2.20 mostram, respectivamente, o isolamento realizado com sucesso das fosfolipases CB-Cdc e CTx-Cdc que, posteriormente, tiveram sua atividade enzimática avaliada na presença do inibidor de fosfolipases A<sub>2</sub> rCdtPLI2.



**Figura 2.19 – Isolamento da CB-Cdc.** A peçonha de *C. d. collilineatus* foi fracionada através de cromatografia de fase reversa na coluna semi-preparativa Jupiter® C18 (250 x 10 mm, Phenomenex) previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição seguiu um gradiente (0-100%) de solução B (ACN 80% em TFA 0,1%).



**Figura 2.20 – Isolamento da CTx-Cdc.** **A)** Filtração molecular da peçonha de *C. d. collilineatus* na coluna *HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S-100 HR* (GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,1 M (pH 7,74) e as frações foram eluídas nessa mesma solução. **B)** Filtração molecular da fração S4 na coluna *HiTrap™ Desalting* (5 mL, GE Healthcare). A coluna foi previamente equilibrada com TFA 0,05% e a fração eluída nessa mesma solução. **C)** Avaliação do grau de pureza CTx-Cdc por cromatografia de fase reversa em coluna com resina C18. A fração foi aplicada na coluna *Vydac®* de resina C4 (250 x 4,6 mm, GRACE) previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição seguiu um gradiente de ACN (0-80%) em TFA 0,1%.



**Figura 2.21 – Avaliação da inibição da atividade enzimática das PLA<sub>2</sub>s CTx-Cdc e CB-Cdc sobre o substrato NOB.** As toxinas (2 µg) **A)** CB-Cdc e **B)** CTx-Cdc foram incubadas com o rCdtPLI2 glicosilado (2, 4 ou 8 µg) e o substrato NOB (500 µM) a 37 °C. A absorbância das amostras foi lida em 425 nm, tendo 600 nm como referência, após 120 min de incubação. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram comparados ao controle positivo (2 µg de CTx-Cdc ou CB-Cdc) e estão expressos como a média ± o desvio padrão, analisados por ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p = 0,0001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Com relação à CTx-Cdc, a incubação dessa toxina com o rCdtPLI2 acabou fazendo com que tivesse um ligeiro aumento em sua atividade enzimática com o aumento da concentração de inibidor utilizado (Figura 2.21B). No entanto, não houve diferença estatística na atividade enzimática utilizando 4 ou 8 µg do rCdtPLI2 glicosilado em todos os tempos analisados. Uma hipótese é que o rCdtPLI2 esteja interagindo com o complexo da CTx-Cdc, impedindo a correta formação do complexo pelas subunidades ácida e básica e, dessa forma, facilitando com que a CB exerça sua ação enzimática.

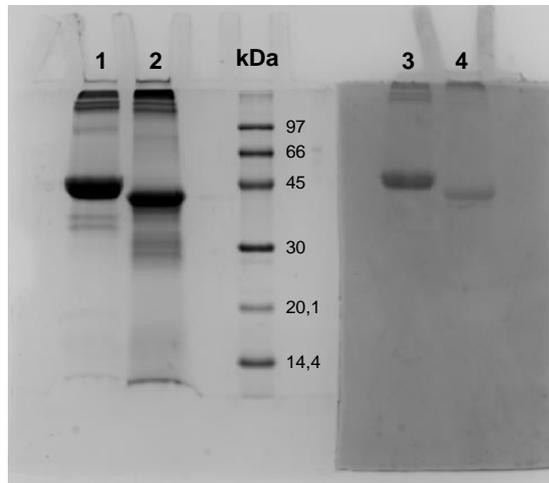
Uma vez que glicosilações podem interferir na interação entre proteínas e o rCdtPLI2 apresenta uma elevada porcentagem de açúcar em sua estrutura (como será demonstrado no decorrer deste trabalho), é possível que as glicosilações presentes na molécula, realizadas pela *Pichia*, atrapalhem a correta interação do rCdtPLI2 com a CTx-Cdc e com a CB-Cdc e, conseqüentemente, impedem que o inibidor reduza suas atividades enzimáticas.

Além do exposto no parágrafo anterior, embora alguns PLIs de serpente tenham inibido a ação enzimática de PLA<sub>2</sub>s ofídicas (FORTES-DIAS *et al.*, 1994; QUIRÓS *et al.*, 2007; SANTOS-FILHO; BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2014), foi identificado no soro da serpente não peçonhenta *Elaphe quadrivirgata* uma proteína homóloga a um α-PLI sem ação inibitória sobre as PLA<sub>2</sub>s testadas naquele estudo (OKUMURA *et al.*, 2003). Todavia, os autores não excluíram a possibilidade dessa proteína ser realmente um PLI e inibir a ação de outras PLA<sub>2</sub>s, como, por

exemplo, uma Lys49-PLA<sub>2</sub> que tem ação miotóxica e não apresenta atividade hidrolítica (OKUMURA *et al.*, 2003). Além disso, o PLI DM64, presente no soro do gambá *Didelphis marsupialis* que apresenta resistência a peçonhas botrópicas, não inibe a ação catalítica de Asp49-PLA<sub>2</sub>, mas é capaz de inibir a miotoxicidade *in vivo* e a citotoxicidade *in vitro* causada pelas miotoxinas I (mt-I/Asp49) e II (mt-II/Lys49) da peçonha de *Bothrops asper* (ROCHA *et al.*, 2002).

#### 2.4.13 Avaliação do conteúdo de carboidratos

Para avaliar a presença de carboidratos ligados ao rCdtPLI2, o inibidor foi, primeiramente, digerido com PNGase F e, a seguir, a mistura reacional foi aplicada em um gel de eletroforese para separação dos componentes (Figura 2.22). O método de coloração do ácido periódico de Schiff (PAS) é uma coloração para glicoproteínas, independente se o açúcar está ligado via um átomo de nitrogênio (N-glicosilação) ou oxigênio (O-glicosilação) (DOERNER; WHITE, 1990). Proteínas que não apresentam carboidratos ligados em sua estrutura não podem ser coradas por esse método.



**Figura 2.22 – Perfil eletroforético para avaliação da N-glicosilação do rCdtPLI2.** SDS-PAGE 13,5% na voltagem constante de 110 V. A primeira metade do gel referente aos poços 1 e 2 e ao marcador de massa molecular foi corada com *Coomassie Brilliant Blue G-250* e a segunda metade referente aos poços 3 e 4 foi corada com ácido periódico de Schiff para visualização das bandas de glicoproteínas, mas as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation. Poços: 1 e 3: rCdtPLI2 reduzido; 2 e 4: rCdtPLI2 reduzido e deglicosilado; kDa: marcador de massa molecular.

O inibidor rCdtPLI2 em sua forma apenas reduzida foi corado pelo PAS, evidenciando a presença de uma glicoproteína, como já era suspeita devido à grande diferença (~11 kDa) entre a massa apresentada pelo inibidor no gel de eletroforese e a sua massa teórica (Figura

2.22). O inibidor foi submetido a uma reação de deglicosilação pela PNGase F, que catalisa a liberação de carboidratos N-ligados a proteínas via um resíduo de asparagina (MERRY; ASTRUTSOVA, 2003). Após a reação, observou-se uma redução em massa de, aproximadamente, 3,4 kDa, o que corresponde a ~6% de N-glicosilação em relação à massa do inibidor apenas reduzido (Figura 2.22).

Os dois  $\beta$ -PLIs já purificados e descritos na literatura formam estruturas triméricas com massa monomérica de ~50 kDa. No entanto, após reação de N-deglicosilação, ambos foram completamente deglicosilados e apresentaram massa molecular estimada por SDS-PAGE em ~39 kDa (OKUMURA *et al*, 1998, 2002), próxima à estimada para o rCdtPLI2 N-deglicosilado (~44 kDa), considerando a acurácia do SDS-PAGE.

As N-glicosilações ocorrem em resíduos de asparagina que fazem parte da tríade Asn-X-Ser/Thr, onde X é qualquer resíduo de aminoácido exceto a prolina e o terceiro resíduo é uma serina ou treonina (MORELLE; MICHALSKI, 2007). No entanto, nem todas as tríades apresentam asparaginas glicosiladas uma vez que outros fatores, como impedimento estéreo e localização da tríade na estrutura, podem dificultar o acesso de transferases para a adição do açúcar (MORELLE; MICHALSKI, 2007).

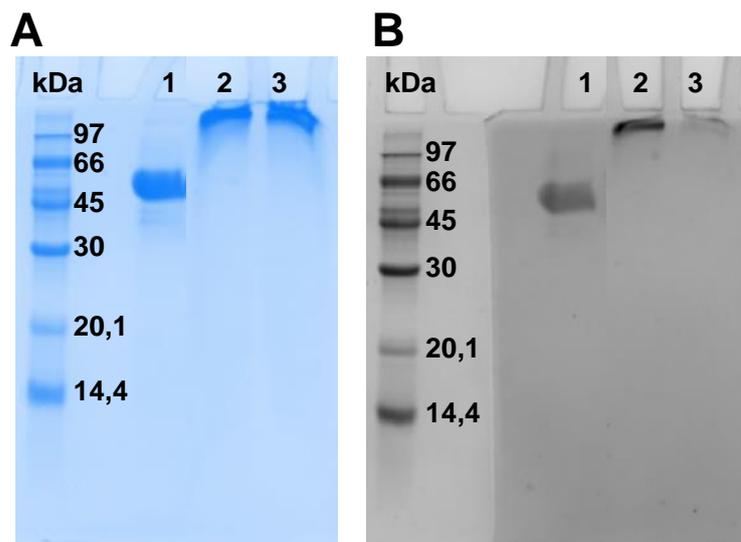
Também foi observado após o tratamento com a PNGase F que o rCdtPLI2 foi corado novamente pelo PAS (Figura 2.22), ainda indicando a presença de glicosilações no inibidor, provavelmente O-glicosilações. Para que ocorram, as O-glicosilações necessitam apenas de um resíduo acessível de serina ou treonina que podem ser glicosilados através do átomo de oxigênio de sua cadeia lateral (MORELLE; MICHALSKI, 2007).

Como estamos produzindo o inibidor de PLA<sub>2</sub> de forma heteróloga, as glicosilações presentes no inibidor recombinante serão diferentes daquelas apresentadas pelo inibidor em sua forma nativa. Na maioria das leveduras, a N-glicosilação apresenta uma estrutura central de Man<sub>8</sub>GlcNAc<sub>2</sub> (8 resíduos de manose e 2 resíduos de N-acetilglicosamina), que é posteriormente processada no complexo de Golgi, envolvendo a adição de um resíduo de manose ligado  $\alpha$ -1,6 à manose  $\alpha$ -1,3 da sequência Man $\alpha$ -1,3Man $\beta$ -1,4GlcNAc no interior da estrutura central (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999). Esse resíduo de manose  $\alpha$ -1,6 adicionado pode ser alongado via ligações  $\alpha$ -1,6 no esqueleto central e/ou sofrer ramificação com di- ou trissacarídeos de manose via ligação  $\alpha$ -1,2 que são, posteriormente, capeados com unidades de manose  $\alpha$ -1,3 ligadas, dando origem à estrutura de *high-manose*. A presença de

oligossacarídeos de manose O-ligados também é comum na maioria das leveduras (BRETTHAUER; CASTELLINO, 1999).

Sendo assim, optou-se por digerir o inibidor rCdtPLI2 com a enzima  $\alpha$ -manosidade para retirada dos resíduos de manose incorporados pela *P. pastoris*. Essa enzima é um tetrâmero composto por subunidades com 44 e 66 kDa e foi extraída das sementes de *Canavalia ensiformis* (“feijão de porco”) (EINHOFF; RÜDIGER, 1988). A  $\alpha$ -manosidade é uma hidrolase ácida (com pH ótimo entre 4 e 5) que libera resíduos  $\alpha$ -1,2,  $\alpha$ -1,3 e  $\alpha$ -1,6 de manose de proteínas glicosiladas (EINHOFF; RÜDIGER, 1988; GNANESH KUMAR *et al.*, 2014; LI, 1966).

Para essa finalidade, usou-se como amostra tanto o inibidor recombinante pré-digerido com PNGase F como o inibidor recombinante sem nenhum tratamento prévio (Figura 2.23). Logo após a reação, foi possível ver a presença de material precipitado no tubo do ensaio e, no gel, observam-se bandas de alta massa molecular provavelmente devido a agregados do inibidor deglicosilado que não migraram na malha do gel (Figura 2.23A).



**Figura 2.23 – Perfil eletroforético do rCdtPLI2 glicosilado e deglicosilado para avaliação de sua O-glicosilação.** SDS-PAGE 13,5% na voltagem constante de 110 V. As amostras das reações de deglicosilação foram aplicadas em duplicata. O primeiro gel (A) foi corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*. O segundo gel (B) foi dividido em duas partes: a primeira contendo o marcador de massa molecular foi corada com *Coomassie Brilliant Blue G-250* e a segunda parte foi corada com ácido periódico de *Schiff* para visualização das bandas de glicoproteínas. As imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e o gel A foi colorido artificialmente pelo *software* Image Lab™. Amostras: 1) rCdtPLI2 reduzido; 2) rCdtPLI2 digerido com  $\alpha$ -manosidade; 3) rCdtPLI2 reduzido e digerido com PNGase F e  $\alpha$ -manosidade.

Na digestão apenas com alfa-manosidade (Figura 2.23B, poço 2), observa-se coloração pelo PAS, evidenciando a presença de outras glicosilações; fato que já foi demonstrado anteriormente pelas N-glicosilações. Por sua vez, após a digestão com PNGase F e com alfa-manosidase, a banda do inibidor praticamente não foi corada pelo PAS, indicando a retirada de

praticamente todos os açúcares (N- e O-ligados) (Figura 2.23B, poço 3). Além disso, deve-se ressaltar que, como há um agregado de proteínas, é possível que a própria alfa-manosidase agregada possa ter sido corada nesse poço, pois apresenta glicosilações nas duas subunidades de 66 kDa (EINHOFF; RÜDIGER, 1988; GNANESH KUMAR *et al.*, 2014).

É importante ressaltar também a partir dos resultados apresentados que o açúcar presente na estrutura do rCdtPLI2 apresenta um papel fundamental na solubilidade desse inibidor e que a deglicolisação do  $\gamma$ -PLI nativo DM64 de *D. marsupialis* também gerou um inibidor insolúvel, não sendo possível sua utilização em estudos cristalográficos (NEVES-FERREIRA, 2020).

No caso do rCdtPLI2, existem 3 possíveis sítios de N-glicosilação (posições 115, 222 e 262), além de 32 resíduos de serina e 15 resíduos de treonina, que poderiam ser alvo de glicosilações realizadas pela *P. pastoris*. Entre os inibidores de PLA<sub>2</sub>s encontrados no sangue de serpentes, inibidores das três classes ( $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ) apresentam glicosilações, mas a glicosilação não parece ter um papel essencial na atividade inibitória dessas proteínas (CAMPOS *et al.*, 2016; FORTES-DIAS *et al.*, 2014). No entanto, hiperglicosilações podem levar ao prejuízo da função desses inibidores (SANTOS-FILHO *et al.*, 2014).

Thwin e colaboradores (2002) realizaram uma análise *in silico* para mapear possíveis locais de interação de um  $\gamma$ -PLI encontrado no sangue da serpente *Python* (PIP) e PLA<sub>2</sub>s. A partir dessa análise, foram sintetizados peptídeos que, posteriormente, foram avaliados quanto a inibição da atividade enzimática de PLA<sub>2</sub> *in vitro* e sua atividade anti-inflamatória *in vivo*. O peptídeo P-PB.I (LPGLPPLSLQNGLY) mostrou ambas as atividades avaliadas e o peptídeo P-PB.III (PGLPPLSLQNG), que representa um segmento menor do sítio proposto, exibiu as melhores atividades anti-PLA<sub>2</sub> tanto *in vitro* como *in vivo* (THWIN *et al.*, 2002). Os decapeptídeos PGLPLSRPNG e PGLPLSHPNG, similares ao P-PB.III estão presentes, respectivamente, nas sequências de  $\gamma$ -PLIs de *B. atrox* e *Micrurus lemniscatus* em regiões expostas ao solvente, podendo participar de interações com PLA<sub>2</sub> e, eventualmente, sua inibição (PICELLI *et al.*, 2017).

Ao analisar a sequência do P-PB.I frente a sequência do rCdtPLI2 (Figura 2.24), observamos que há um alinhamento entre as duas sequências na região 92-104 do rCdtPLI2. Nessa região, não existem possíveis sítios para N-glicosilação, mas há um potencial sítio na posição 115, próximo à região alinhada. Além disso, nessa região existem um resíduo de serina e outro de treonina possíveis de serem O-glicosilados via sua cadeia lateral (Figura 2.24).

Portanto, caso esses resíduos estejam realmente glicosilados, é possível que essa modificação pós-traducional interfira com a atividade anti-PLA<sub>2</sub> do rCdtPLI2.

rCdtPLI2	HHHHHHENLYFQGVLYCPPTPAPEVTEFVCNSPSLREFPTGFPPARTKSI SVEFTQVSSL	60
P-PB.I	-----	0
rCdtPLI2	GMEALQGLPNLQELHLSNNRLKTLPNGLFRNLPOLHTLDL SNNLLEDLPPEIFTNASSLT	120
P-PB.I	-----LPGL-PLSLONGLY-----	13
rCdtPLI2	HLSLSENQLAELRPSWFESLEKLRILGLDHNQVKEIPISCFDKLEELTSLDLSFNLLHRL	180
P-PB.I	-----	13
rCdtPLI2	APEMFGLDNLERLVLESNPIQCI VKKTFHWHPKLSVLSLKNSSLTHIIMGVDFPLDQLE	240
P-PB.I	-----	13
rCdtPLI2	LLDLSDNELSTMDDPVYKPSANLSLDLSGNRWACDCRLENLLRWIKDHNHLYSKEEFVC	300
P-PB.I	-----	13
rCdtPLI2	ASPKHFKGERATSLQTYQICPC	322
P-PB.I	-----	13

**Figura 2.24 – Alinhamento entre as sequências do rCdtPLI2 e P-PB.I.** O alinhamento foi gerado pela ferramenta MultAlin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>). Os resíduos altamente conservados estão destacados em negrito e resíduos não conservados estão em negrito e vermelho. Potenciais sítios de N-glicosilação são mostrados em azul e negrito e os destaques em amarelo indicam posições no rCdtPLI2 (entre os resíduos alinhados) que podem ser alvos de O-glicosilação.

Recentemente, Fortes-Dias e colaboradores (2019) encontraram que o inibidor rCdtbβPLI apresenta uma estrutura semelhante a ferradura similar a outras proteínas ricas em leucina. Na face côncava da estrutura, estão resíduos principalmente com características ácidas na região N-terminal e nos domínios 1 a 6 (Figura 2.25), responsáveis pela interação com regiões positivas (N e C-terminal e β-wing) da CB-Cdt (subunidade básica da crotoxina de *C. d. terrificus*). Além disso, nessa região côncava também está presente um resíduo de serina (Ser160), também presente no rCdtPLI2 (Figura 2.25), que participa de interações de hidrogênio com a CB-Cdt. Portanto, uma vez que esse resíduo está exposto, é possível que tenha sido glicosilado pela *P. pastoris* e interfira com a atividade do rCdtPLI2. Adicionalmente, estão presentes também outros resíduos de serina e um de treonina (Figura 2.25), que são passíveis de sofrerem glicosilação. Sendo assim, é de suma importância determinar em quais resíduos do rCdtPLI2 foram incorporadas glicosilações pela *P. pastoris*.

```

CdtsβPLI  -----ALYCPPTPAPESVTEFVCNSPSLREFPTGFPARAKMISVEFTQVSSL47
rCdtPLI2  HHHHHHENLYFQGVLYCPPTPAPESVTEFVCNSPSLREFPTGFPARTKSISVEFTQVSSL60
          .*****:*****:*****

CdtsβPLI  GVEALQGLPNLQELHLSNNRLKSLPSGLFRNLPQLHTLDLSRNFLEDLPPEIFINASSLT107
rCdtPLI2  GMEALQGLPNLQELHLSNNRLKTLPNGLFRNLPQLHTLDLSNNLEDLPPEIFTNASSLT120
          *:*****:*****:*****:*****:*****

CdtsβPLI  HLSLSENQLAELRPSWFESLEKLRILGLDHNQVKEIPISCFDKLKELTSLDLSFNLIHRL167
rCdtPLI2  HLSLSENQLAELRPSWFESLEKLRILGLDHNQVKEIPISCFDKLEELTSLDLSFNLLHRL180
          *****:*****:*****

CdtsβPLI  TTGMFSGLDNLERLVLESNPIQCIMGRTFWHRPKLSVLSLKNSSLTHVIMGVFQ-LDQLE226
rCdtPLI2  APEMFSGLDNLERLVLESNPIQCIVKKTFWHHPKLSVLSLKNSSLTHIIMGVFDPLDQLE240
          : *****:*****:*****:*****:*****

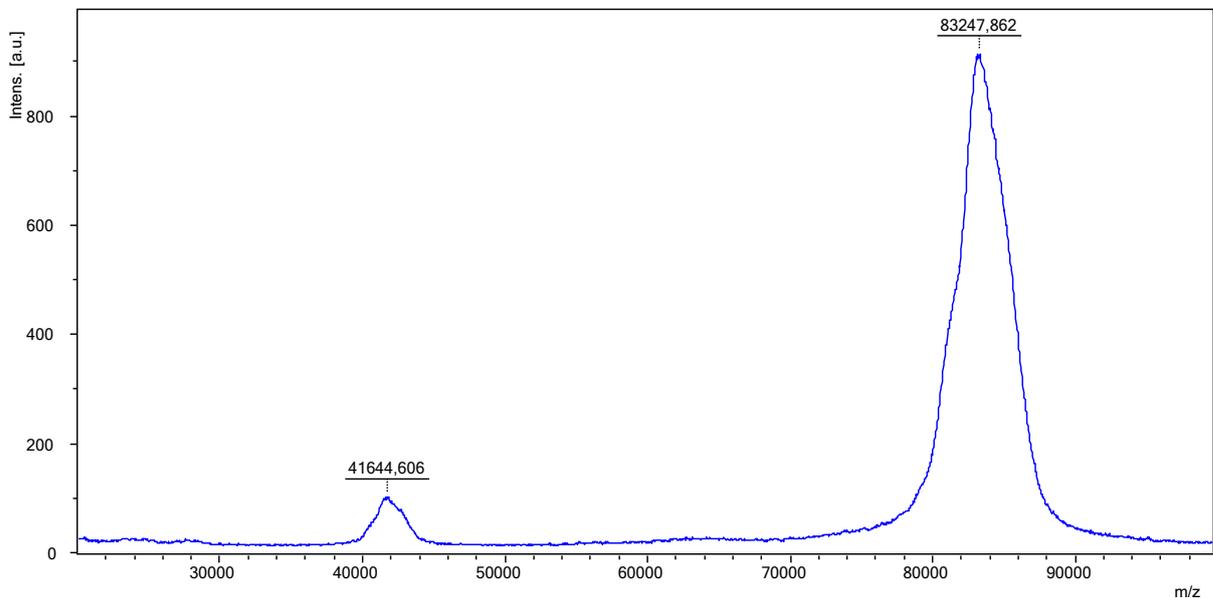
CdtsβPLI  LLDLSDNEFTLDPPVHKPSANFSLDLSGNPWACDCRLENLLRWLKDHNIHLYSKEEFVC286
rCdtPLI2  LLDLSDNELSTMDDPVYKPSANLSLDLSGNRWACDCRLENLLRWIKDHNIHLYSKEEFVC300
          *****:*****:*****:*****:*****

CdtsβPLI  ASPKHFKGEHATSLQTSQICPC      308
rCdtPLI2  ASPKHFKGERATSLQTYICPC      322
          *****:*****:*****
    
```

**Figura 2.25** – Alinhamento entre as sequências do Cdt**s**β**P**LI (GenBank MH479024) e rCdt**P**LI2. Resíduos conservados e relacionados com interação com a CB-Cdt estão destacados em azul. Em vermelho, são destacados resíduos não conservados. Possíveis sítios de N-glicosilação estão destacados em amarelo.

#### 2.4.14 Determinação da massa molecular do rCdt**P**LI2

A massa molecular do rCdt**P**LI2 foi determinada por MALDI-TOF MS (Figura 2.26).

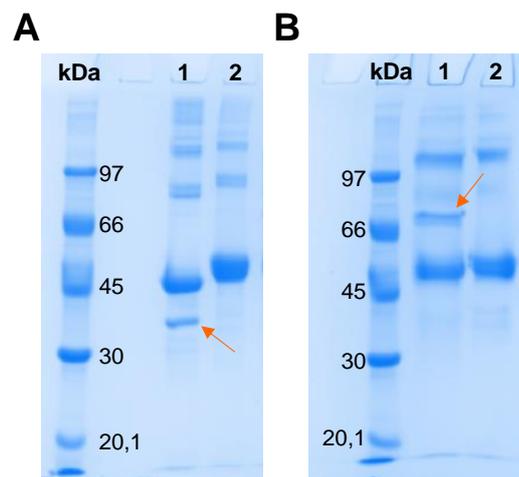


**Figura 2.26** – Determinação da massa molecular do rCdt**P**LI2 glicosilado. A amostra do inibidor foi diluída na matriz de ácido sinapínico e os dados foram adquiridos no modo linear positivo pelo espectrômetro de massas Ultraflex II MALDI TOF/TOF (Bruker).

O rCdtPLI2 apresenta massa molecular teórica de 36717,88 Da e a massa determinada foi de 41643,599 Da. Há uma diferença de 4925,719 Da que corresponde às modificações pós-traducionais: glicosilações e oxidação dos resíduos de cisteína para formação das ligações dissulfeto. Esse valor representa, aproximadamente, 12% de glicosilações presente na estrutura do rCdtPLI2. Considerando que existe cerca de 6% de N-glicosilações (Figura 2.22), há também, possivelmente, por volta de 6% de O-glicosilações na estrutura do rCdtPLI2. Observa-se ainda que existe algum componente com  $m/z$  de 83247,862 (Figura 2.26). É provável que esse pico representa duas moléculas de rCdtPLI2 que sofreram agregação após a etapa de cromatografia em fase reversa e que foram ionizadas com apenas um próton. Os picos largos no espectro são devido às diferentes populações do inibidor causadas pela heterogeneidade das glicosilações e isótopos (DAI *et al.*, 2015).

#### 2.4.15 Avaliação preliminar da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre PLA<sub>2</sub>s de serpentes

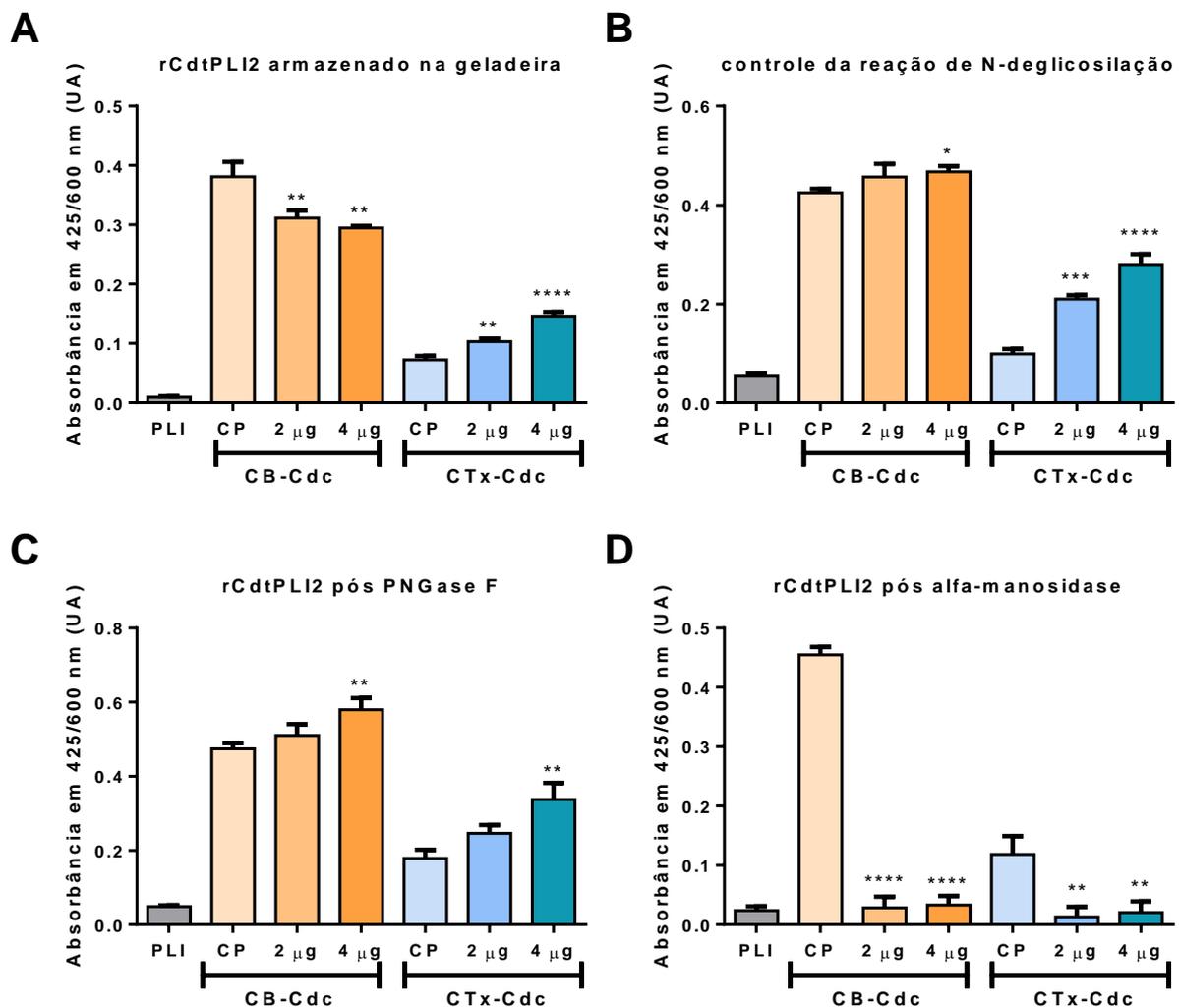
Para avaliar a atividade inibitória do rCdtPLI2 pós-reação de deglicosilação sobre CB-Cdc e CTx-Cdc, o inibidor foi deglicosilado sob condições não desnaturantes (Figura 2.27). Sendo assim, foi necessário maior tempo de reação com a PNGase F do que o realizado anteriormente.



**Figura 2.27 – Perfil eletroforético do rCdtPLI2 glicosilado e deglicosilado em SDS-PAGE 10% para avaliação das reações de deglicosilação com PNGase F e  $\alpha$ -manosidase.** A corrida foi realizada sob 110 V. Os géis foram corados com *Coomassie Brilliant Blue G-250*, mas suas imagens foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e coloridos artificialmente pelo *software* Image Lab™. **A)** Reação de N-deglicosilação com PNGase F. Poços: **1)** rCdtPLI2 pós-N-deglicosilação; **2)** rCdtPLI2 controle da reação. A seta alaranjada indica a presença da PNGase F. **B)** Reação de deglicosilação com  $\alpha$ -manosidase. Poços: **1)** rCdtPLI2 pós-deglicosilação; **2)** rCdtPLI2 controle da reação. A seta alaranjada indica a subunidade de 66 kDa da  $\alpha$ -manosidase.

Observou-se redução de ~8% em massa do inibidor pós-N-deglicosilação (Figura 2.27A), valor comparável ao obtido anteriormente considerando a acurácia do SDS-PAGE ( $\pm 10\%$ ) para estimativa de massa molecular (WEBER; OSBORN, 1969). Com relação à digestão com a enzima alfa-manosidase, observa-se no final do gel de SDS-PAGE (Figura 2.27B) que a migração das amostras foi prejudicada possivelmente pela diminuição de sua solubilidade e, conseqüentemente, leva a um resultado errôneo na estimativa da massa molecular.

No ensaio de inibição da atividade fosfolipásica, verificou-se que o rCdtPLI2 ainda glicosilado e armazenado na geladeira foi capaz de causar uma pequena redução na atividade da CB-Cdc (Figura 2.28A).



**Figura 2.28** – Avaliação da atividade do rCdtPLI2 deglicosilado sobre PLA<sub>2</sub> de serpentes. As toxinas (2  $\mu$ g) CB-Cdc e CTx-Cdc foram incubadas com o rCdtPLI2 deglicosilado (2 ou 4  $\mu$ g) e o substrato NOB (500  $\mu$ M) a 37 °C (C e D). As enzimas também foram incubadas com o rCdtPLI2 glicosilado armazenado na geladeira (A) ou controle da reação de N-deglicosilação (B) nas mesmas proporções. A absorbância das amostras foi lida em 425 nm, tendo 600 nm como referência, após 120 min de incubação. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram comparados ao controle positivo (2  $\mu$ g de CTx-Cdc ou CB-Cdc) e estão expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão, analisados por ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p = 0,0001$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). O controle negativo (PLI) foi realizado com 4  $\mu$ g de inibidor.

Uma explicação para isso seria o re-enovelamento do inibidor com o tempo em um tampão adequado, pois a eluição em TFA e acetonitrila na última etapa cromatográfica pode ter alterado o enovelamento adequado do inibidor. Esse tempo na geladeira pode ter permitido que parte das moléculas voltasse à sua configuração mais adequada e, mesmo estando hiper-glicosilado, pode ter sido capaz de interagir com a enzima, ainda que com menor eficiência.

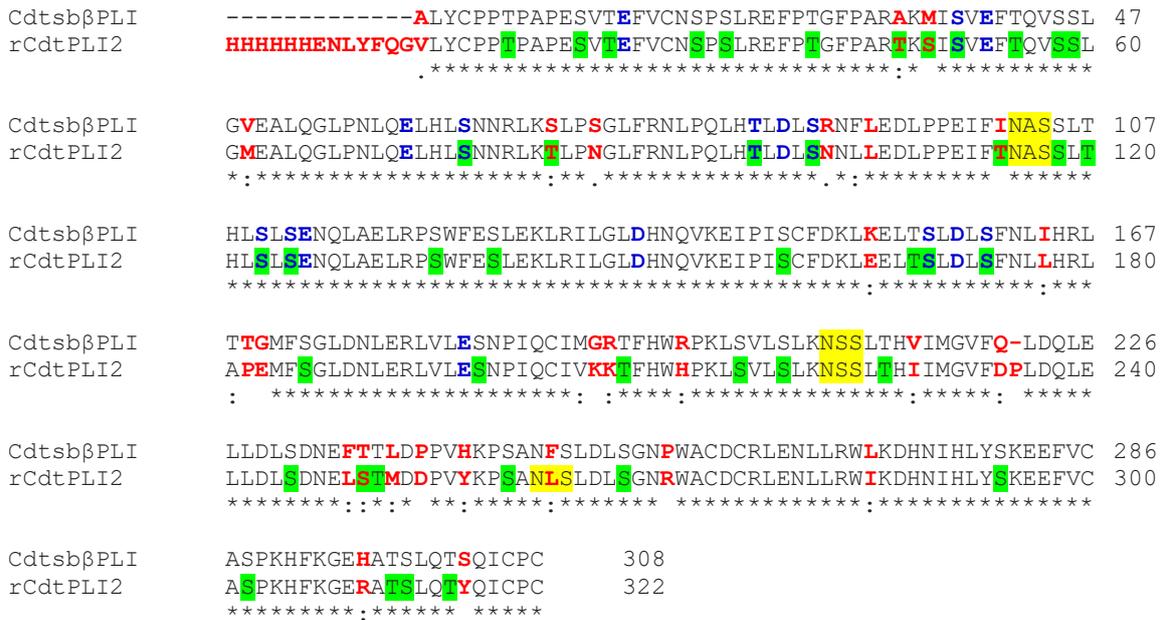
Quando deglicosilado com a PNGase F (Figura 2.28C), ocorreu aumento na atividade enzimática da toxina conforme aumentou-se a quantidade de inibidor utilizado, fato este também verificado quando na presença do rCdtPLI2 glicosilado, mas que foi submetido às mesmas condições da reação (37 °C, 6 h, 300 rpm) (Figura 2.28B).

Muitos fatores são conhecidos por afetar a estabilidade/função de uma proteína, como pH, força iônica, presença de solvente orgânico e temperatura. No caso da temperatura, com o seu aumento, ligações responsáveis por manter a proteína em seu estado nativo enovelado vão se desfazendo até chegar um momento em que não é mais possível a proteína manter sua conformação nativa e se desenovela (FIELDS *et al.*, 2015). Como foi realizado um longo período de incubação para digestão da amostra, acredita-se que a temperatura tenha causado alguma mudança na estrutura tridimensional do rCdtPLI2 fazendo com ainda fosse capaz de interagir com a CB-Cdc, mas incapaz de inibir sua ação e até mesmo facilitando o acesso do substrato à enzima, como evidenciado pelo aumento da atividade catalítica da CB-Cdc (Figura 2.28).

Com relação à inibição da CTx-Cdc, tanto para o rCdtPLI2 glicosilado armazenado na geladeira (Figura 2.28A) como para o inibidor glicosilado submetido às condições da digestão pela PNGase F (Figura 2.28B) e o inibidor digerido com PNGase F (Figura 2.28C), observou-se um aumento na atividade catalítica da CTx-Cdc conforme aumentou-se a quantidade de inibidor utilizado no ensaio. Fato semelhante já foi verificado e discutido anteriormente (Figura 2.21). A hipótese é que a interação do rCdtPLI2 com a CTx-Cdc esteja impedindo a correta formação desse complexo e facilitando o acesso do substrato à subunidade básica do complexo, que apresenta atividade catalítica.

No entanto, após a digestão do rCdtPLI2 com a alfa-manosidase, houve inibição da atividade catalítica de ambas as toxinas (Figura 2.28D), sem diferença estatística quando comparadas as amostras de PLA<sub>2</sub> com inibidor *versus* a amostra contendo apenas com inibidor, evidenciando que a hiper-glicosilação realizada pela *P. pastoris* tem interferência na atividade do inibidor de fosfolipases rCdtPLI2.

De fato, observa-se na sequência primária do rCdtPLI2 (Figura 2.29) a presença de muitos resíduos de serina e treonina próximos a (ou em) regiões de interação de  $\beta$ -PLI com a CB-Cdt (FORTES-DIAS *et al.*, 2019). Além disso, ressalta-se novamente o papel da Ser<sup>160</sup> que participa de interações de hidrogênio com a CB-Cdt (FORTES-DIAS *et al.*, 2019) e a glicosilação desse resíduo poderia levar à perda/diminuição de atividade do inibidor. Adicionalmente, potenciais sítios para N-glicosilações parecem estar localizados em regiões mais distantes da face de interação com a CB (Figura 2.29).



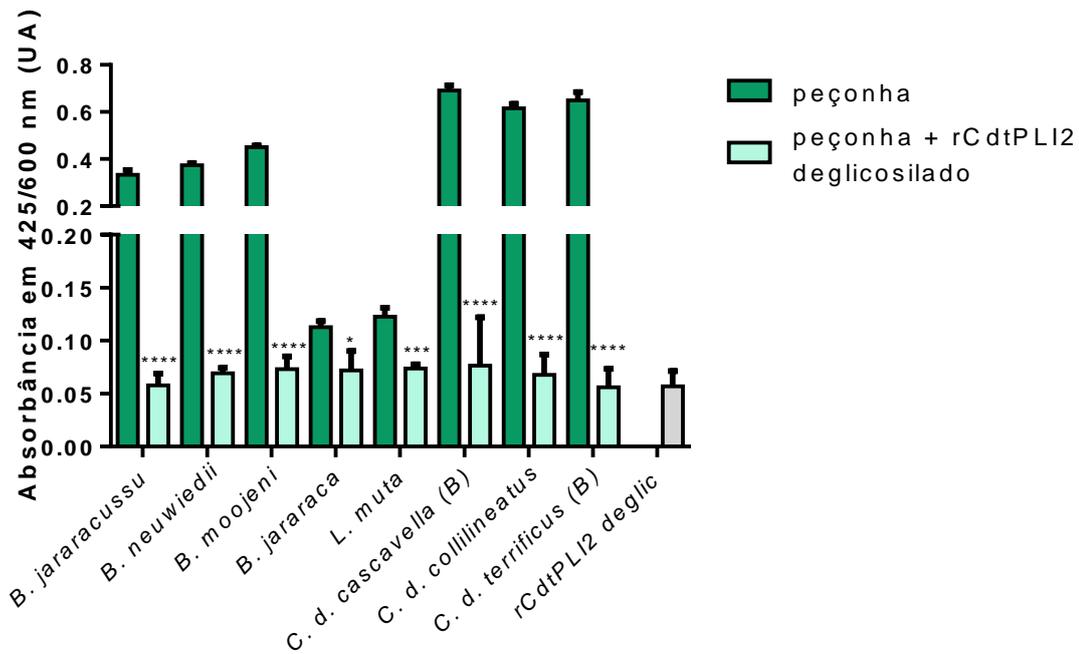
**Figura 2.29** – Alinhamento entre as sequências do Cdt**s** $\beta$ PLI (GenBank MH479024) e rCdtPLI2 com destaque para as glicosilações. Resíduos conservados e relacionados com interação com a CB-Cdt estão em negrito e azul. Em negrito e vermelho, estão resíduos não conservados. Potenciais sítios para N-glicosilação são destacados em amarelo enquanto possíveis sítios para O-glicosilação no rCdtPLI2 estão destacados em verde.

Alguns PLIs nativos do sangue de serpentes apresentam resíduos de asparagina conservados e N-glicosilados, mas essa glicosilação não parece interferir com sua atividade *in vitro* (LIZANO *et al.*, 2000; NOBUHISA *et al.*, 1998; OLIVEIRA *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2003). Isso também é observado para o CNF de *C. d. terrificus* cuja porção de carboidrato não é essencial para sua atividade inibitória (FORTES-DIAS *et al.*, 2014). Entretanto, é possível a interferência de hiper-glicosilações realizadas por *P. pastoris* na atividade inibitória de um PLI expresso nesse sistema (SANTOS-FILHO *et al.*, 2014). Sendo assim, será considerada, posteriormente, a expressão do CdtPLI2 em um sistema heterólogo diferente para evitar tais modificações realizadas pela *P. pastoris*.

#### 2.4.16 Avaliação da atividade do rCtPLI2 deglicosilado sobre diferentes peçonhas ofídicas e suas PLA<sub>2</sub>s

Foram avaliados 20 µg das peçonhas de *B. jararacussu*, *B. neuwiedii*, *B. moojeni*, *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* e 40 µg das peçonhas de *B. jararaca* e *L. muta* (que apresentaram menor atividade fosfolipásica em uma avaliação preliminar), sempre respeitando a quantidade de 1 µg de inibidor deglicosilado para cada 10 µg de peçonha.

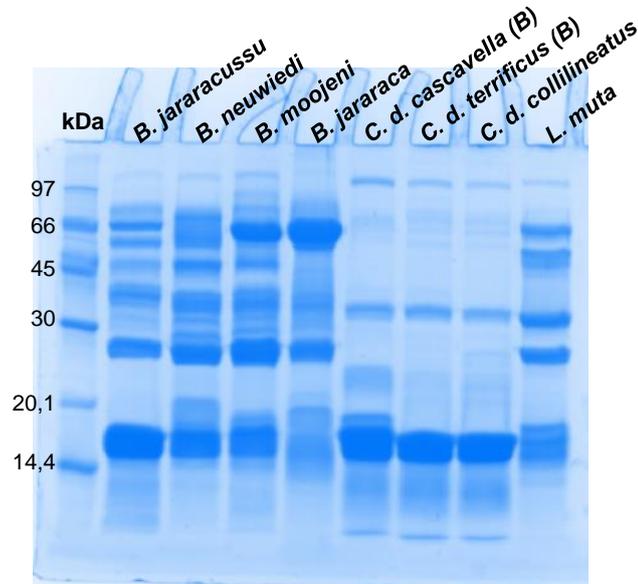
Em todos os casos, o rCdtPLI2 deglicosilado reduziu efetivamente a atividade enzimática de PLA<sub>2</sub> (Figura 2.30). Embora alguns inibidores isolados do sangue de serpentes do gênero *Bothrops* não tenham demonstrado ação frente à CB de *C. d. terrificus* (OLIVEIRA *et al.*, 2008; SOARES *et al.*, 2003), o rCdtPLI2 de *C. d. terrificus* além de inibir a ação enzimática da CB e da CTx também foi eficaz na inibição de peçonhas laquética e botrópicas.



**Figura 2.30 – Atividade inibitória do rCdtPLI2 deglicosilado sobre a atividade fosfolipásica de diferentes peçonhas ofídicas brasileiras.** As peçonhas (20 µg de *B. jararacussu*, *B. neuwiedii*, *B. moojeni*, *C. d. cascavella*, *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus* ou 40 µg de *B. jararaca* e *L. muta*) foram incubadas com o rCdtPLI2 deglicosilado (2 ou 4 µg, mantendo proporção em massa de 10 µg peçonha: 1 µg inibidor) e o substrato NOB (500 µM) em 37 °C. A absorbância das amostras foi lida em 425 nm, tendo 600 nm como referência, após 120 min de incubação. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados de cada peçonha na presença do inibidor foram comparados aos seus respectivos controles positivos (peçonha na ausência do inibidor) e estão expressos como a média ± o desvio padrão, analisados por ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett (\* $p \leq 0,05$ ; \*\*\* $p \leq 0,001$ ; \*\*\*\* $p \leq 0,0001$ ). Abreviações: B, peçonha branca; deglic, deglicosilado.

As amostras de peçonhas avaliadas também foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida (Figura 2.31) para estimar seu conteúdo de fosfolipases através da densitometria

das bandas de proteínas do gel. PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes, geralmente, apresentam massa molecular entre 10-20 kDa (XIAO *et al.*, 2017), portanto, foi avaliada qual a proporção dos componentes presentes nessa faixa de massa em cada peçonha (Figuras 2.31 e 2.32, Tabela 2.1). Também constam na tabela 2.1, as PLA<sub>2</sub> já isoladas das peçonhas analisadas no experimento e as proporções de PLA<sub>2</sub>s já descritas na literatura para cada peçonha avaliada.

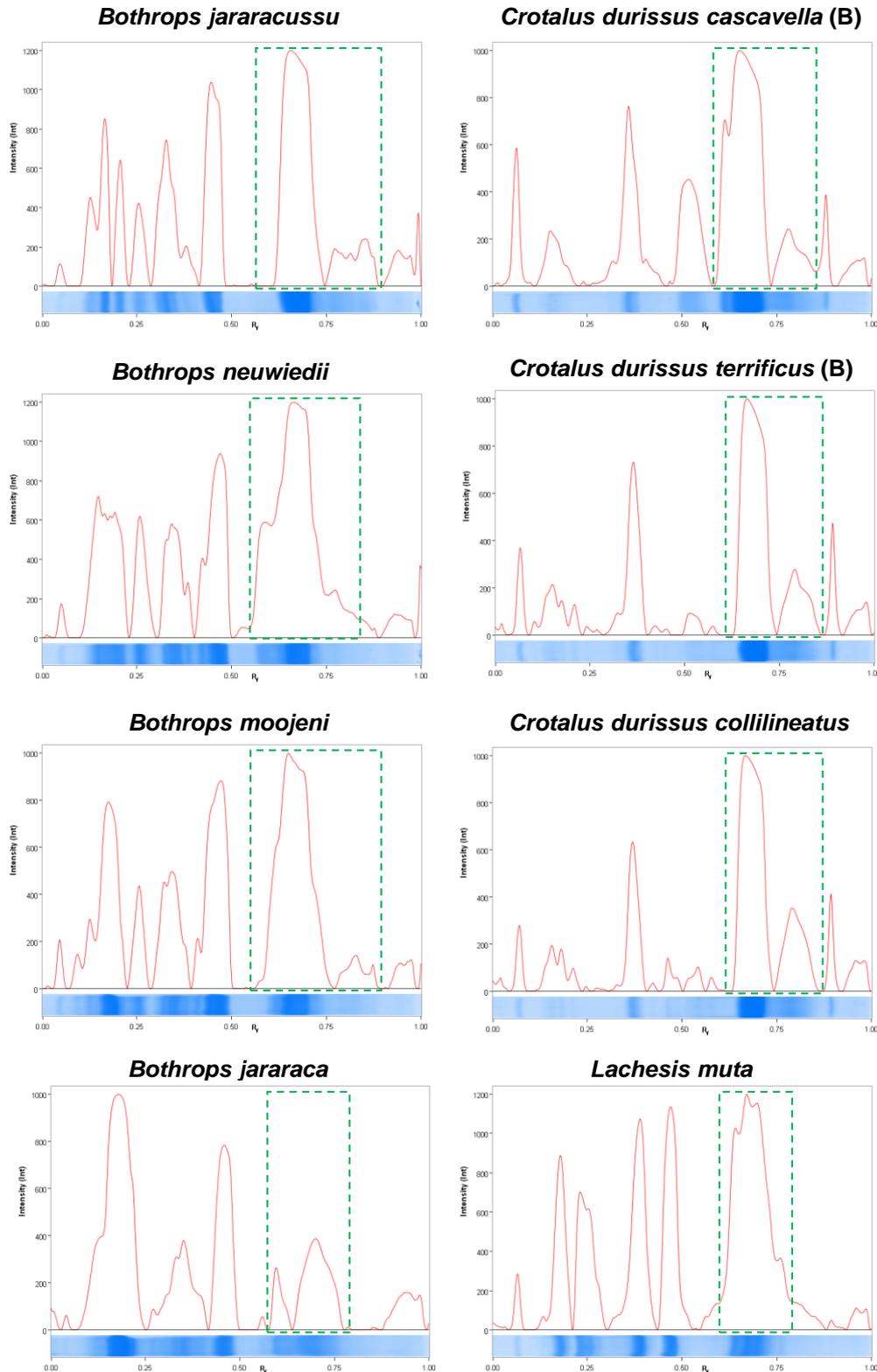


**Figura 2.31 – Perfil eletroforético de diferentes peçonhas ofídicas brasileiras com importância médica.** Foram aplicados 70 µg de cada peçonha no gel de SDS-PAGE 13,5% e a corrida foi realizada sob 110 V. O gel foi corado com *Coomassie Brilliant Blue G-250*, mas a imagem foi adquirida em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e colorida artificialmente pelo *software Image Lab™*. Abreviação: B, peçonha branca.

As peçonhas do gênero *Crotalus* apresentam alta proporção de PLA<sub>2</sub>s em sua composição, podendo chegar até cerca de 90% (Tabela 2.1). Nas peçonhas analisadas, foram estimados entre 59-67% de PLA<sub>2</sub> (Tabela 2.1). Sabe-se que grande parte dessas enzimas está formando o complexo da crotoxina, mas outras PLA<sub>2</sub>s também estão presentes nessas peçonhas, podendo chegar a até 18% (BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2019; VIEIRA *et al.*, 2013). Um exemplo é a intercro, uma PLA<sub>2</sub> com atividade catalítica e características estruturais semelhantes à CB, mas provavelmente incapaz de formar o complexo neurotóxico da crotoxina junto com a crotapotina (VIEIRA *et al.*, 2013).

Além disso, os componentes da crotoxina (CA e CB) podem apresentar diferentes isoformas (BEGHINI *et al.*, 2000; FAURE *et al.*, 1994; FUSCO *et al.*, 2015), porém, normalmente são referidos apenas como crotapotina ou PLA<sub>2</sub> de *Crotalus*, o que leva a uma dificuldade na diferenciação dessas isoformas. A inibição da atividade das peçonhas crotálicas

avaliadas é um reflexo direto da inibição tanto da PLA<sub>2</sub> básica como do complexo da crotoxina, como já avaliado na inibição dessas enzimas anteriormente (Figura 2.28).



**Figura 2.32 – Densitometria das bandas de proteínas do SDS-PAGE realizado com peçonhas brasileiras de interesse médico. A densitometria foi realizada pelo software Image Lab™. Os retângulos verdes indicam as bandas utilizadas na estimativa da proporção de PLA<sub>2</sub> em cada peçonha.**

Tabela 2.1 – PLA<sub>2</sub> e componentes entre 10-20 kDa nas peçonhas botrópicas, crotálicas e laquética avaliadas na presença do inibidor rCdtPLI2 deglicosilado.

Peçonha	Proporção de PLA <sub>2</sub> (%) já descrita na literatura	Proporção de componentes (%) entre 10-20 kDa por SDS-PAGE	PLA <sub>2</sub> s já descritas na literatura	Resíduo 49	pI	Atividade catalítica	Miotoxicidade	Referências
<i>B. jararacussu</i>	25-35 [1]	47	SIISPIIA	ND	A	S	S (pouca)	[2]
			SIISPIIB	D49	A	S	S (pouca)	
			SIISPIIIA	ND	A	S	S (pouca)	
			SIISPIIIB	ND	A	S	S (pouca)	
			J-I	ND	A	S	S (pouca)	
			S <sub>III</sub> -SP <sub>I</sub>	ND	A	S	N	
			S <sub>III</sub> -SP <sub>II</sub>	ND	A	S	N	
			S <sub>III</sub> -SP <sub>III</sub>	ND	N	baixa	N	
			BthTX-I (S <sub>III</sub> -SP <sub>IV</sub> , Bj VII)	K49	B	N	S	
			BthTX-II	D49	B	S	S	
			BthA-I	D49	A	S	N	
			Bj IV	D49	B	S	S	
			Bj V	D49	B	S	ND	
Bj VIII	K49	B	N	S				
<i>B. neuwiedii</i>	8 [3]	46	BnSP-5a, BnSP-6a	ND	B	ND	S	[4]
			BnMG-6a, BnMG-6b, BnMG-6c	ND	B	ND	S	
			BnSP-7	K49	B	N	S	
			P-1	ND	A	S	N	
			P-2	ND	A	S	N	
			P-3	ND	A	S	ND	
			<i>B. neuwiedii</i> myotoxin I	K49	B	N	S	

Peçonha	Proporção de PLA <sub>2</sub> (%) já descrita na literatura	Proporção de componentes (%) entre 10-20 kDa por SDS-PAGE	PLA <sub>2</sub> s já descritas na literatura	Resíduo 49	pI	Atividade catalítica	Miotoxicidade	Referências
<i>B. moojeni</i>	11-20 [5]	42	BnuTX-I	K49	B	N	S	[6]
			Bn IV	K49	B	N	S	
			BmooTX-I	D49	A	S	S	
			BmTX-I	D49	B	S	S	
			BM-PLA <sub>2</sub>	D49	A	S	ND	
			MjTX-I	K49	B	N	S	
			MjTX-II	K49	B	N	S	
			MjTX-III	K49	B*	N	ND	
			MjTX-IV	K49	B*	N	ND	
			BmooPLA <sub>2</sub>	D49	A	S	N	
BomoTX	K49	B	ND	ND				
<i>B. jararaca</i>	3-6 [7]	21	BJ-PLA <sub>2</sub>	D49	A	S	ND	[8]
			BJ-PLA <sub>2</sub> -I	D49	A	S	ND	
			Jar-III	ND	B	N	S (pouco)	
<i>L. muta</i>	10,8 [9]	46	Lmr-PLA <sub>2</sub>	D49	A	S	N	[10]
			LM-PLA <sub>2</sub> -II	D49	A	S	S	
			LM-PLA <sub>2</sub> -I	D49	A	S	S	
			LmTX-I	D49	B	S	ND	
			LmTX-II	D49	B	S	ND	
			LmutTX	K49	B	N	ND	
<i>C. d. cascavella</i>	90 [11]	59	Crotapotina (CA)	-	A	N	N	[12]
			PLA <sub>2</sub> (CB)	ND	B	S	S	

Peçonha	Proporção de PLA <sub>2</sub> (%) já descrita na literatura	Proporção de componentes (%) entre 10-20 kDa por SDS-PAGE	PLA <sub>2</sub> s já descritas na literatura	Resíduo 49	pI	Atividade catalítica	Miotoxicidade	Referências
<i>C. d. collilineatus</i>	72-78 [13]	67	Crotapotina (CA)	-	A	N	N	[14]
			PLA <sub>2</sub> (CB)	D49	B	S	S	
<i>C. d. terrificus</i>	48-90 [15]	63	Crotapotina (CA)	-	A	N	N	[16]
			PLA <sub>2</sub> (CB)	D49	B	S	S	
			Intercro	D49	B	S	S	

Abreviações: A, ácida; B, básica; B\*, básica (determinada por similaridade); N, neutra; BthTX-I, bothropstoxin-I; BthTX-II, bothropstoxin-II; ND, não determinado; MjTX-I, myotoxin-I; MjTX-II, myotoxin-II

[1] SOUSA *et al.*, 2013

[2] ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2002; BONFIM *et al.*, 2001; CINTRA *et al.*, 1993; DOS SANTOS *et al.*, 2008; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988; KETELHUT *et al.*, 2003; PEREIRA *et al.*, 1998; PONCE-SOTO *et al.*, 2006

[3] SOUSA *et al.*, 2013

[4] ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; CORRÊA *et al.*, 2016; DANIELE, BIANCO, FIDELIO, 1995; DANIELE *et al.*, 1997; GEOGHEGAN *et al.*, 1999; RODRIGUES *et al.*, 1998; SOARES *et al.*, 2000; TOYAMA *et al.*, 2011; VIDAL, CATTANEO, STOPPANI, 1972

[5] AGUIAR *et al.*, 2019; AMORIM *et al.*, 2018

[6] ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; CALGAROTTO *et al.*, 2008; LOMONTE *et al.*, 1990; NONATO *et al.*, 2001; PERCHUC *et al.*, 2010; REICHL *et al.*, 1989; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008; SILVEIRA *et al.*, 2013; SOARES *et al.*, 2000; ZHANG *et al.*, 2017

[7] NICOLAU *et al.*, 2017; SOUSA *et al.*, 2013

[8] ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; CEDRO *et al.*, 2018; SERRANO *et al.*, 1999

[9] PLA *et al.*, 2013

[10] CORDEIRO *et al.*, 2015; DAMICO *et al.*, 2005; DINIZ-SOUSA *et al.*, 2018; FULY *et al.*, 2002

[11] BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010

[12] BEGHINI *et al.*, 2000; DE OLIVEIRA *et al.*, 2003; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004

[13] BOLDRINI-FRANÇA *et al.*, 2010; OLIVEIRA *et al.*, 2018

[14] BEGHINI *et al.*, 2000; PONCE-SOTO *et al.*, 2002, 2007; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004; TOYAMA *et al.*, 2005

[15] CALVETE *et al.*, 2010; GEORGIEVA *et al.*, 2010; MELANI *et al.*, 2015, capítulo 1 deste trabalho

[16] BEGHINI *et al.*, 2000; FAURE *et al.*, 1994; FUSCO *et al.*, 2015; HENDON; FRAENKEL, 1971; HERNANDEZ-OLIVEIRA *et al.*, 2005; OLIVEIRA *et al.*, 2002; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004; RÜBSAMEN, BREITHAUPT, HABERMANN, 1971; TOYAMA *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2013

No caso da peçonha laquética, existem PLA<sub>2</sub> tanto ácidas como básicas que apresentam atividade catalítica, além de uma PLA<sub>2</sub> básica sem atividade enzimática (Tabela 2.1). Além disso, Pla e colaboradores (2013) relataram a presença de cerca de 10% de PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativa na peçonha de *L. muta rhombeata* e a Lmr-PLA<sub>2</sub> (ácida e cataliticamente ativa) corresponde a cerca de 6% das proteínas dessa peçonha (CORDEIRO, 2013). Embora dados da literatura demonstrem que β-PLIs possam ser mais específicos para PLA<sub>2</sub> com características básicas (OHKURA *et al.*, 1997) e como não houve diferença estatística significativa entre a amostra de peçonha com o inibidor e a amostra que continha apenas o inibidor, infere-se que o rCdtPLI2 deglicosilado seja capaz de inibir a ação enzimática tanto de PLA<sub>2</sub> básicas como ácidas.

As peçonhas botrópicas também apresentam PLA<sub>2</sub> ácidas e básicas em uma mesma peçonha (Tabela 2.1). As PLA<sub>2</sub>s básicas são geralmente cataliticamente inativas, sendo a miotoxicidade uma de suas principais ações (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; GEOGHEGAN *et al.*, 1999; XIAO *et al.*, 2017) (Tabela 2.1). Por sua vez, as PLA<sub>2</sub> botrópicas ácidas são, em geral, cataliticamente ativas (Tabela 2.1) embora também já tenha sido relatado que possam apresentar ação miotóxica (KETELHUT *et al.*, 2003; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008). Essa ação miotóxica de PLA<sub>2</sub> cataliticamente ativa seria resultado da hidrólise dos fosfolípidos de membrana celular, resultando na liberação de lisofosfolípidos, instabilidade da membrana e necrose do músculo esquelético (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

Entre as peçonhas do gênero *Bothrops* analisadas, a peçonha de *B. jararaca* é a que apresenta uma menor proporção (mas ainda grande) de PLA<sub>2</sub> em sua composição (Tabela 2.1). Nesse caso, mesmo utilizando o dobro de peçonha no ensaio, a atividade fosfolipásica não foi tão elevada na ausência do inibidor, mas foi possível verificar a diminuição de atividade quando o rCdtPLI2 deglicosilado foi adicionado (Figura 2.30).

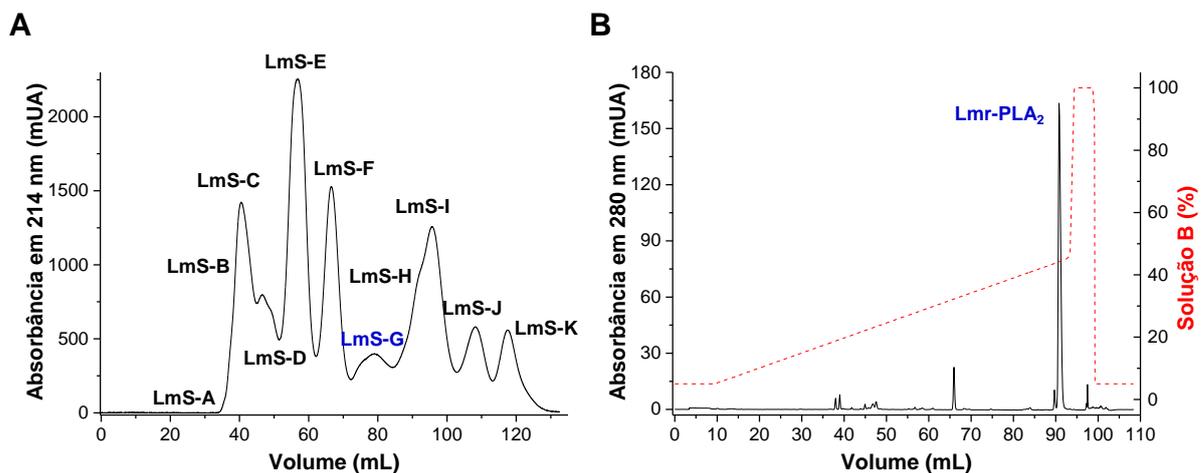
Embora nessa peçonha também existam PLA<sub>2</sub> tanto ácidas como básicas, essa baixa atividade catalítica provavelmente está relacionada a uma maior proporção de Jar-III (PLA<sub>2</sub> básica sem atividade catalítica) (ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000) em relação a outras PLA<sub>2</sub> (ácidas cataliticamente ativas). Cedro e colaboradores (2018) encontraram 0,35% de BJ-PLA<sub>2</sub>-I (PLA<sub>2</sub> ácida com atividade enzimática), mas não descarta que essa enzima seja a mesma (BJ-PLA<sub>2</sub>) isolada anteriormente por Serrano *et al.* (1999) cuja proporção encontrada foi de 0,2% na peçonha. Além disso, deve-se levar em consideração que outras PLA<sub>2</sub> ainda podem estar presentes no proteoma da peçonha de *B. jararaca* visto a grande quantidade de transcritos já

identificados na glândula de peçonha dessa serpente que codificam essa família de enzimas (CIDADE *et al.*, 2006; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO *et al.*, 2015).

A peçonha de *B. jararacussu* apresenta PLA<sub>2</sub>s cataliticamente ativas tanto ácidas como básicas além de uma grande proporção (~25%) da miotoxina BthTX-I, que é desprovida de atividade enzimática (DOS SANTOS *et al.*, 2008) (Tabela 2.1). A BthTX-II, embora seja uma D49-PLA<sub>2</sub> básica miotóxica, apresenta baixa atividade catalítica que parece ser resultado de mutações extras em pontos estratégicos, como 5° resíduo N-terminal que participa do canal que fornece o acesso do substrato ao sítio catalítico (PEREIRA *et al.*, 1998).

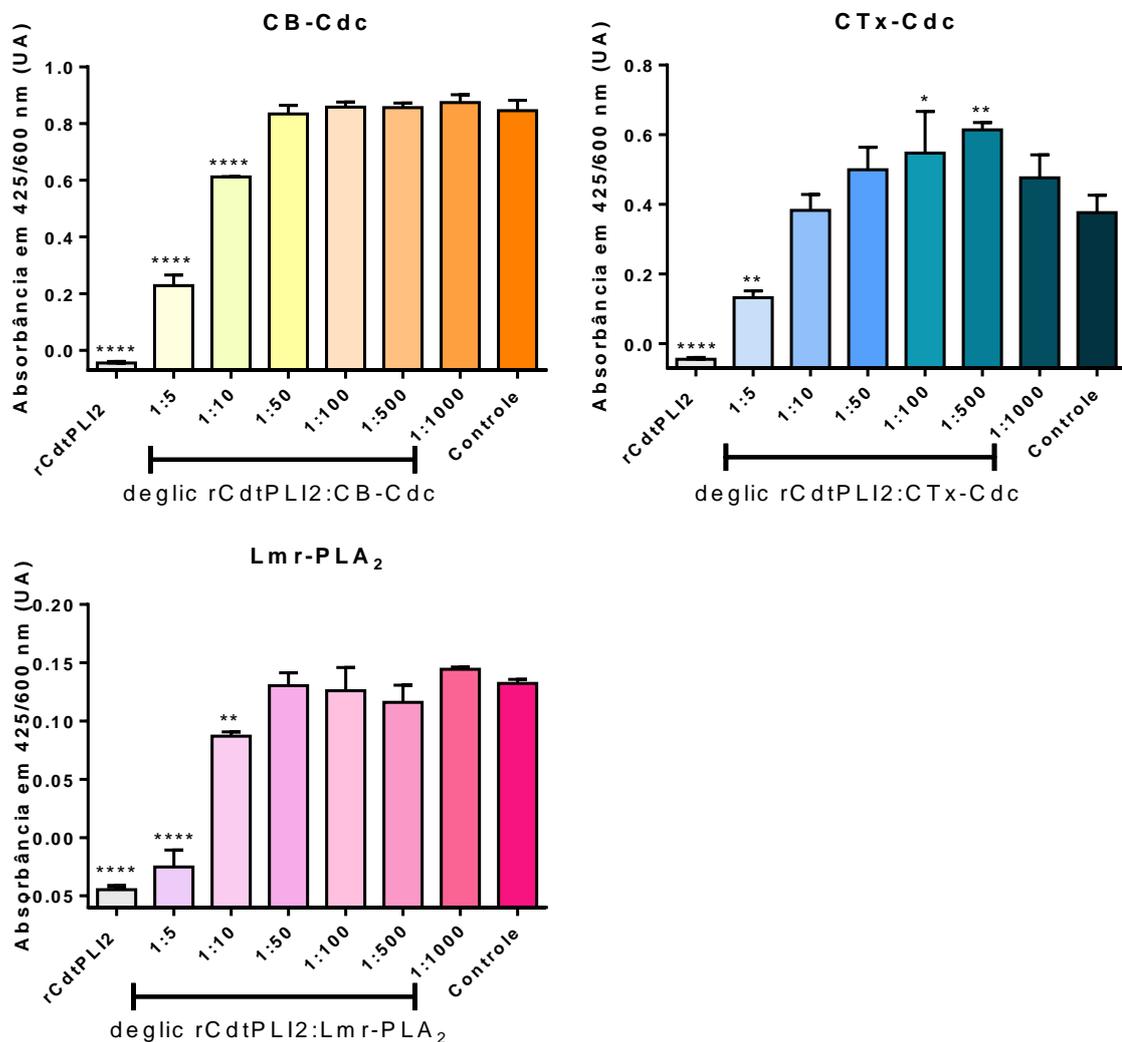
Por sua vez, a peçonha de *B. neuwiedii* apresenta PLA<sub>2</sub>s ácidas cataliticamente ativas e miotoxinas básicas sem atividade catalítica (Tabela 2.1). Fato semelhante ocorre com a peçonha de *B. moojeni* cujas PLA<sub>2</sub> básicas, geralmente, não apresentam atividade catalítica (exceção para a BmTX-I uma D49-PLA<sub>2</sub> miotóxica) (Tabela 2.1). Sendo assim, a inibição dessas peçonhas pelo rCdtPLI2 deglicosilado corrobora a ideia de que esse inibidor é capaz de interagir com PLA<sub>2</sub>s ácidas e impedir a atividade enzimática desses componentes.

Para melhor avaliar a ação do rCdtPLI2 deglicosilado frente a PLA<sub>2</sub> ácidas e básicas, sua atividade inibitória foi novamente testada na presença da CB-Cdc (PLA<sub>2</sub> básica), CTx-Cdc (PLA<sub>2</sub> dimérica predominantemente ácida) e Lmr-PLA<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub> ácida). As PLA<sub>2</sub> de *Crotalus* foram isoladas como já descrito anteriormente. Já a Lmr-PLA<sub>2</sub> de *L. muta* foi isolada como descrito por Cordeiro *et al.* (2015) e o resultado do isolamento encontra-se na figura 2.33.



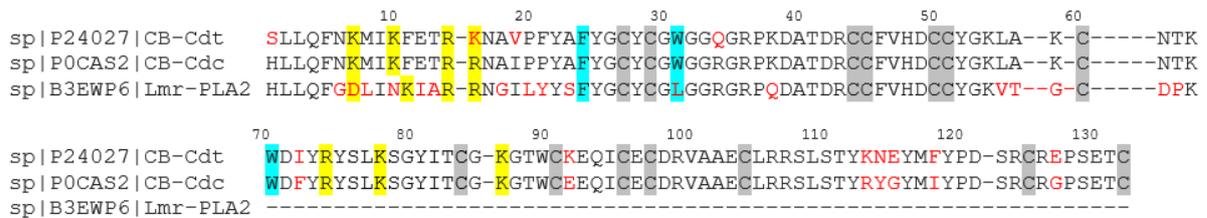
**Figura 2.33 – Isolamento da Lmr-PLA<sub>2</sub>.** A) Filtração molecular da peçonha de *L. muta* na coluna HiPrep™ 16/60 Sephacryl® S100 HR. A coluna foi previamente equilibrada com tampão acetato de sódio 50 mM com NaCl 0,15 M (pH 6) e as frações eluídas nessa mesma solução. A eluição foi monitorada pelo sistema Äkta pure em 214 nm. B) Cromatografia de fase reversa da fração LmS-G. A fração foi aplicada em uma coluna C18 (250 x 4,6 mm, Phenomenex) previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição das frações seguiu um gradiente de ACN (0-80%) em TFA 0,1%, ou seja, 100% da solução B. A eluição foi monitorada pelo sistema Äkta purifier UPC-10 (GE Healthcare) em 280 nm.

O rCdtPLI2, deglicosilado com a enzima  $\alpha$ -manosidase como discutido anteriormente, foi incubado em diferentes proporções com as toxinas ( $13,8 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$ ) (Figura 2.34). A partir da proporção de 1:50 (inibidor:toxina), não foi possível a inibição da CB-Cdc e da Lmr-PLA<sub>2</sub> (Figura 2.34). No caso desta última, a proporção de 1:5 foi suficiente para reduzir drasticamente a atividade enzimática. Já para a CB-Cdc, na proporção de 1:5 é possível observar uma redução de cerca de 73% da atividade enzimática dessa enzima. Por sua vez, no caso da CTx-Cdc, a partir da proporção de 1:10 já não houve diferença na redução da atividade em relação ao controle positivo e, na proporção de 1:5, a atividade foi reduzida em, aproximadamente, 65% (Figura 2.34).



**Figura 2.34 – Avaliação da inibição de PLA2s ácidas e básicas pelo rCdtPLI2 deglicosilado em diferentes proporções.** CB-Cdc, CTx-Cdc e Lmr-PLA<sub>2</sub> ( $13,8 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$ ) foram incubadas com o rCdtPLI2 deglicosilado em diferentes proporções inibidor:toxina (1:5, 1:10, 1:50, 1:100, 1:500 e 1:1000) e o substrato NOB (500  $\mu\text{M}$ ) em 37 °C. A absorbância das amostras foi lida em 425 nm, tendo 600 nm como referência, após 120 min de incubação. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram comparados ao controle positivo ( $13,8 \times 10^{-5} \mu\text{mol}$  de CB-Cdc, CTx-Cdc ou Lmr-PLA<sub>2</sub>) e estão expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão, analisados por ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett (\* $0,05 < p < 0,01$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ).

Fortes-Dias e colaboradores (2019) destacaram a importância na interação com o inibidor *Cdtsb*βPLI de uma região R1 que contém resíduos do N-terminal e da folha beta da CB-Cdt. Esses resíduos encontram-se destacados em amarelo na figura 2.35. Além disso, também são relevantes os resíduos Phe<sup>24</sup>, Trp<sup>31</sup> e Trp<sup>70</sup> que interagem com o inibidor através de interações hidrofóbicas (Figura 2.35, destaque em azul).



**Figura 2.35** – Alinhamento de sequências das fosfolipases CB-Cdt, CB-Cdc e Lmr-PLA<sub>2</sub>. O alinhamento foi gerado pelo servidor Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Resíduos não conservados estão em vermelho e resíduos conservados de cisteína foram destacados em cinza. Resíduos do N-terminal e da folha-beta que fazem parte da interação com β-PLIs estão em destaque amarelo. Com destaque em azul, estão os resíduos que fazem interações hidrofóbicas com β-PLIs. A numeração da sequência está de acordo com o padronizado por Renetseder *et al.* (1985).

A CB-Cdc (sp|P0CAS2) apresenta 91% de identidade e 95% de similaridade com a CB-Cdt (sp|P24027) utilizada no estudo de Fortes-Dias *et al.* (2019). As regiões comentadas anteriormente são altamente conservadas entre essas duas isoformas, havendo apenas uma mutação conservativa na posição 16. Portanto, sugere-se que a interação do rCdtPLI2 deglicosilado com a CB-Cdc ocorra nos mesmos sítios descritos para a CB-Cdt. Outro ponto importante é que os resíduos acima citados não fariam parte de interações CB-CB em solução, podendo estar disponíveis para interação com o rCdtPLI2 mesmo que a toxina assuma um estado tetramérico (MARCHI-SALVADOR *et al.*, 2008).

Por sua vez, a Lmr-PLA<sub>2</sub> (sp|B3EWP6) apresenta 63 e 78% de identidade e similaridade, respectivamente, com a CB-Cdt (sp|P24027) entre os resíduos alinhados, mas apenas a sequência parcial da Lmr-PLA<sub>2</sub> está disponível nos bancos de dados. Comparando-se a região N-terminal da Lmr-PLA<sub>2</sub> com a CB-Cdt, observa-se que embora ocorra uma mutação não conservativa na posição 7 (K → D), há uma mutação conservativa na posição 16 (K → R), assim como ocorre na CB-Cdc, e outros resíduos importantes para a interação com β-PLIs também estão presentes (Figura 2.35). Sendo assim, há indícios de que esses resíduos da região N-terminal também possam participar da interação entre Lmr-PLA<sub>2</sub> e rCdtPLI2. Nada se pode concluir a respeito das regiões de folha-beta e de interações hidrofóbicas uma vez que não se conhece a sequência da Lmr-PLA<sub>2</sub> nessas regiões.

Com relação à CTx-Cdc, como já discutido anteriormente, esse componente é um complexo formado por duas PLA<sub>2</sub> associadas não covalentemente: uma básica (CB) e outra ácida (CA), no qual a subunidade ácida permite que a subunidade básica alcance receptores na junção neuromuscular, podendo levar até à parada respiratória no envenenamento crotálico (FAURE; XU; SAUL, 2011; FERNANDES; AGUIAR; DAHER, 2008).

Alguns resíduos importantes para a interação CA-CB fazem parte da região R1 (Lys<sup>10</sup>, Arg<sup>14</sup>, Lys<sup>16</sup>) e da região de interações hidrofóbicas (Phe<sup>24</sup>, Trp<sup>31</sup> e Trp<sup>70</sup>) na CB que são passíveis de interação com β-PLIs (FAURE; XU; SAUL, 2011; FORTES-DIAS *et al.*, 2019). Adicionalmente, os resíduos Trp<sup>31</sup> e Trp<sup>70</sup> apresentam grande relevância na estabilidade do complexo ao interagirem com Asp<sup>89</sup> e Asp<sup>99</sup> na cadeia β da CA, dificultando o acesso do substrato ao sítio catalítico. No entanto, a presença de uma Ser na primeira posição N-terminal da CB mudaria a posição do Trp<sup>70</sup>, facilitando acesso do substrato e justificando as diferentes atividades enzimáticas encontradas entre as isoformas de crotocina (FAURE; XU; SAUL, 2011).

Além disso, um estudo do γ-PLI CNF/CICS de *C. d. terrificus* mostrou que esse inibidor é capaz de causar a dissociação do complexo CA-CB através de uma competição com a CA e ligação à CB, formando um complexo não tóxico (FAURE; XU; SAUL, 2011). Portanto, como alguns sítios de interação dos β-PLIs são os mesmos em que ocorre a interação CA-CB, acredita-se que o rCdtPLI2 deglicosilado possa também ser capaz de deslocar a CA e ligar-se à CB-Cdc, bloqueando o acesso do substrato ao sítio catalítico e inibindo sua atividade enzimática.

Com relação às serpentes do gênero *Bothrops*, o envenenamento causado por elas apresenta tanto ações locais como sistêmicas, sendo característicos: intensa inflamação, miotoxicidade e alterações na coagulação sanguínea, manifestando-se com dor, edema, bolhas, sangramento, necrose tecidual e, até mesmo, hemorragias sistêmicas e insuficiência renal (OLIVEIRA *et al.*, 2017). Um dos grandes desafios no seu tratamento é o desenvolvimento de inibidores capazes neutralizar ações locais, impedindo, por exemplo, a miotoxicidade, que, muitas vezes, não é eficientemente neutralizada pela terapia convencional (BRYAN-QUIRÓS *et al.*, 2019).

É amplamente relatado que as PLA<sub>2</sub> presentes nessas peçonhas estão intrinsicamente relacionadas com os efeitos miotóxicos e inflamatórios observados (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1995; TEIXEIRA *et al.*, 2009). Além disso, algumas PLA<sub>2</sub> de serpentes da família

Viperidae (incluindo as do gênero *Bothrops*) têm mostrado ação anticoagulante (KETELHUT *et al.*, 2003; VERHEIJ *et al.*, 1980; XIAO *et al.*, 2017) e, recentemente, foi proposto que a PLA<sub>2</sub> BomoTX de *B. moojeni* é capaz de induzir dor através da excitação de neurônios sensoriais via liberação de ATP, com consequente ativação de receptores purinérgicos (ZHANG *et al.*, 2017).

Muitos estudos têm mostrado a importância da região C-terminal das Lys49-PLA<sub>2</sub> no desenvolvimento de sua ação miotóxica (FERNANDES *et al.*, 2014). Essa região é composta por uma combinação de aminoácidos básicos e hidrofóbicos, sendo o segmento 117-122 o determinante-chave para interação com a membrana celular, além da participação da Lys<sup>20</sup> (CHIOATO *et al.*, 2002; DOS SANTOS; SOARES; FONTES, 2009; FERNANDES *et al.*, 2014). Adicionalmente, destaca-se a importância dos resíduos Lys<sup>80</sup> e Lys<sup>127</sup>, que auxiliam no ancoramento à membrana (DOS SANTOS; SOARES; FONTES, 2009).

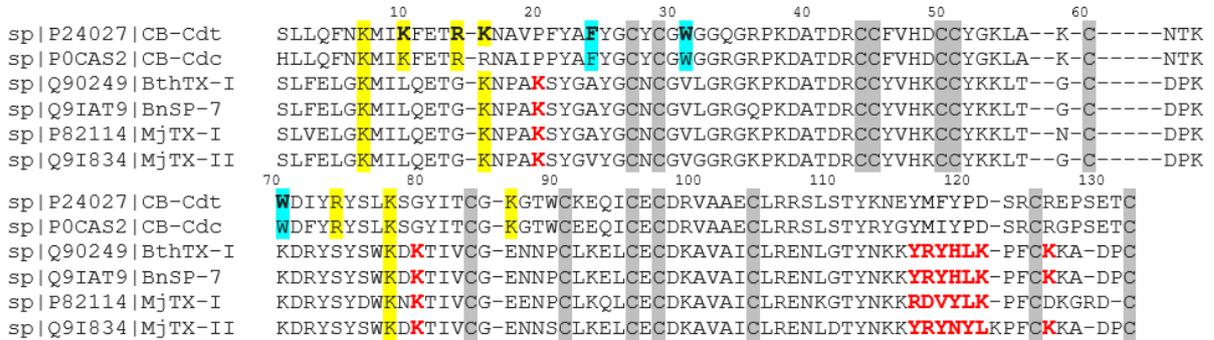
Uma comparação de Lys49-PLA<sub>2</sub> miotóxicas com a CB de *Crotalus* revela que não são conservados os sítios hidrofóbicos e nem os resíduos 10, 14, 74 e 87 capazes de interagir com β-PLIs nas PLA<sub>2</sub>s básicas de *Crotalus* (Figura 2.36A). Entretanto, são conservadas as lisinas das posições 7, 14 e 78, que também participam dessas interações e, além disso, as lisinas 20 e 80 das Lys49-PLA<sub>2</sub> botrópicas localizam-se próximas às regiões R1 e de folha beta para interação com β-PLIs. Portanto, esses resíduos básicos e também a região básica e hidrofóbica da porção C-terminal, que fica exposta para interação com a membrana celular, poderiam ser alvo de interações com PLIs. No entanto, novos estudos são necessários para confirmar esta hipótese.

Com relação às miotoxinas que são Asp49-PLA<sub>2</sub>, a porção C-terminal também está convenientemente localizada para interagir com membranas e também apresenta resíduos hidrofóbicos e carregados positivamente expostos ao solvente, podendo levar a um mecanismo de miotoxicidade similar ao proposto para as Lys49-PLA<sub>2</sub> (FERNANDES *et al.*, 2014). Além disso, sabe-se que a hidrólise de fosfolípidos de membrana catalisada pelas Asp49-PLA<sub>2</sub> é necessária para seu efeito miotóxico, embora não seja o fator determinante, uma vez que existem Asp49-PLA<sub>2</sub> que não induzem a miotoxicidade (SALVADOR *et al.*, 2017).

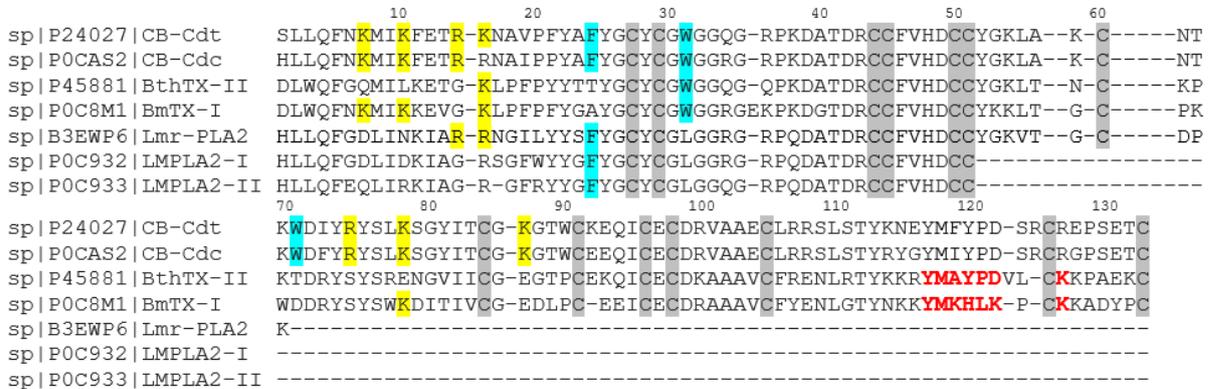
Uma comparação dessas enzimas com as PLA<sub>2</sub>s básicas de *Crotalus* (Figura 2.36B) revelou que, em geral, não há conservação dos resíduos envolvidos na interação CB-PLI e também não apresentam as lisinas 20 e 80 envolvidas com a miotoxicidade das Lys49-PLA<sub>2</sub>. Sendo assim, existe a possibilidade que o rCdtPLI2 possa interagir com a região básica C-

terminal dessas proteínas. Estudos de *docking* para o mapeamento das interações entre miotoxinas e o rCdtPLI2 poderiam confirmar esta hipótese.

**A**



**B**



**Figura 2.36 – Alinhamento de seqüências de PLA<sub>2</sub>s botrópicas A) Lys49 e B) Asp49 com CB-Cdt e CB-Cdc.** O alinhamento foi gerado pelo servidor Clustal Omega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>). Resíduos conservados de cisteína foram destacados em cinza. Resíduos do N-terminal e da folha-beta que fazem parte da interação da CB com β-PLIs estão com destaque amarelo. Com destaque em azul, estão os resíduos que fazem interações hidrofóbicas da CB com β-PLIs. Em negrito e vermelho estão os resíduos relacionados com a miotoxicidade de Lys49-PLA<sub>2</sub>s. A numeração da seqüência está de acordo com o padronizado por Renetseder *et al.* (1985).

**2.4.17 Avaliação preliminar *in vivo* da ação anti edematogênica do rCdtPLI2**

Foram realizados dois ensaios para a avaliação preliminar *in vivo* da ação anti edematogênica do rCdtPLI2 e os resultados estão expressos nas figuras 2.37 e 2.38. Em um primeiro momento, foram avaliados 8 grupos experimentais (Figura 2.37). Os animais neste experimento apresentaram peso médio de 13,9 g, variando entre 10,8-19 g/animal. Os grupos controle consistiram em animais inoculados com o rCdtPLI2 glicosilado ou após a reação de deglicosilação com a enzima alfa-manosidase. O edema induzido nesses grupos utilizando apenas o inibidor foi de, aproximadamente, 20% (Figura 2.37), similar ao obtido por Bordon *et*

*al.* (2012) utilizando apenas solução tamponante. Para inoculação das toxinas, a massa de toxina ( $\mu\text{g}$ ) utilizada por Bordon *et al.* (2012) foi convertida em  $\mu\text{mol}$ . Para a administração das amostras de toxina incubadas com o rCdtPLI2, utilizou-se a proporção de 1  $\mu\text{mol}$  inibidor: 2  $\mu\text{mol}$  toxina, sendo a proporção de inibidor maior do que a proporção analisada no ensaio de inibição da atividade enzimática realizado anteriormente de 1:5 (Figura 2.34).

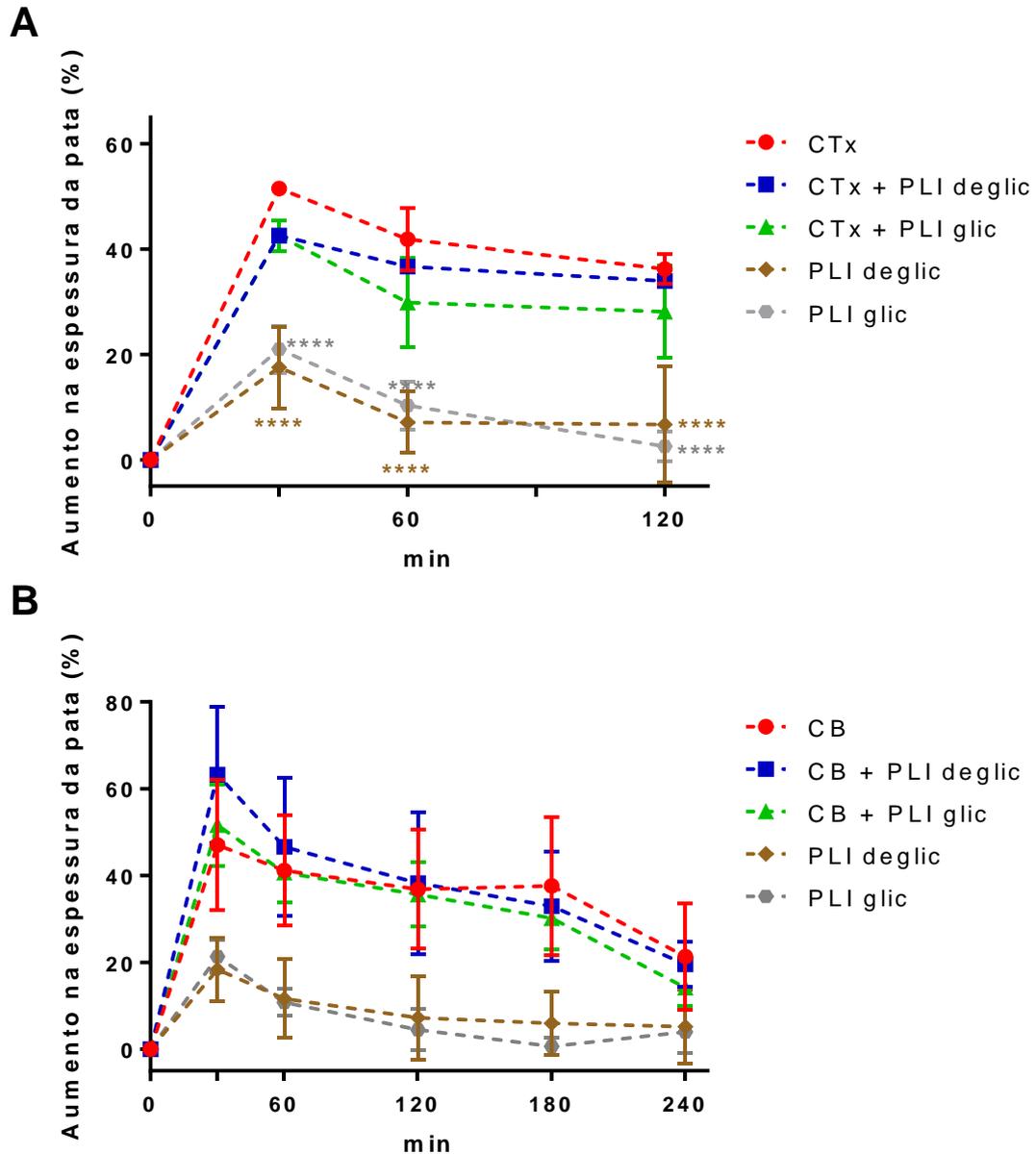
As PLA<sub>2</sub> e crotoxina de *Crotalus* são toxinas que apresentam um pronunciado efeito edematogênico (BORDON *et al.*, 2012; RANGEL-SANTOS *et al.*, 2004). É possível observar que a CB-Cdc e CTx-Cdc induziram, aproximadamente, 50% de aumento na pata dos camundongos nos grupos em que os animais foram inoculados apenas com as toxinas (Figura 2.37).

Nos grupos em que os camundongos foram inoculados com a CTx-Cdc, os animais já estavam quietos e passivos com apenas 60 min de experimentação e, com 140 min, todos os animais haviam morrido. Embora tenha sido utilizada a mesma concentração de Ctx do que Bordon e colaboradores (2012), as mortes podem estar relacionadas ao menor peso dos animais neste experimento e/ou à maior neurotoxicidade da CTx-Cdc do que a CTx de *C. d. terrificus* visto que existem 2 grandes grupos de crotoxina: as que são mais neurotóxicas e menos enzimaticamente ativas e as que são menos neurotóxicas, porém com maior atividade enzimática (FAURE; BON, 1987; FAURE *et al.*, 1994; FAURE *et al.*, 1991; FAURE; XU; SAUL, 2011).

Por sua vez, nos grupos em que a CTx-Cdc foi previamente incubada com o rCdtPLI2 (tanto glicosilado como após a reação de deglicosilação), observa-se que houve uma redução da indução de edema (Figura 2.37A) embora os resultados ainda não tenham sido estatisticamente diferentes do grupo inoculado apenas com a CTx-Cdc. Entretanto, houve redução de ~13% na área sob a curva do grupo em que a CTx-Cdc foi pré-incubada com o rCdtPLI2 deglicosilado em comparação ao grupo em que foi administrada apenas a CTx-Cdc (Figura 2.37A).

Esse resultado pode ser um sinal de que o rCdtPLI2 é capaz de inibir a ação dessa toxina *in vivo*, mas uma nova avaliação deve ser realizada para confirmar essa suspeita. Um dos motivos para uma pequena redução no edema seria o fato de que, *in vivo*, existe a possibilidade de que a concentração de inibidor necessária para inibição da PLA<sub>2</sub> seja maior do que a utilizada *in vitro*. Portanto, uma maior proporção inibidor:PLA<sub>2</sub> deveria ser avaliada. Já nos grupos em que os camundongos foram inoculados apenas com a CB-Cdc, não ocorreram mortes no

decorrer do experimento. Todavia, os resultados foram inconclusivos para a ação inibitória do rCdtPLI2 tanto glicosilado quanto após a reação de deglicosilação (Figura 2.37B).



**Figura 2.37 – Experimentação animal 1 da avaliação preliminar *in vivo* da ação antiedematogênica do rCdtPLI2.** **A)** A avaliação da ação inibitória sobre a CTx-Cdc durou 120 min. A incubação da toxina com inibidor seguiu a proporção 1:2 (toxina:inibidor). Os resultados foram comparados ao controle positivo de indução de edema ( $13,8 \times 10^{-5}$   $\mu\text{mol}$  de CTx-Cdc) e estão expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão, analisados por *two-way* ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni (\*\*\*\* $p < 0,0001$ ). **B)** A avaliação da ação inibitória sobre a CB-Cdc durou 240 min. A incubação da toxina com inibidor seguiu a proporção 1:5 (toxina:inibidor). Os resultados foram comparados ao controle positivo de indução de edema ( $13,8 \times 10^{-5}$   $\mu\text{mol}$  de CB-Cdc) e estão expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão. Abreviações: PLI deglic: PLI deglicosilado pela  $\alpha$ -manosidase; PLI glic: PLI glicosilado.

Já existem relatos na literatura de PLIs presentes no sangue de serpentes que apresentam ações *in vivo* contra ações de PLA<sub>2</sub>. O  $\alpha$ BjussuMIP reduziu ~30% a atividade enzimática de Asp49-BthTX-II e Asp49-PrTX-III, mas apenas ~10% a atividade da Asp49-CB de *C. d. terrificus* na proporção de 1:5 (inibidor:PLA<sub>2</sub>) (OLIVEIRA *et al.*, 2008). Por sua vez, ensaios *in vivo* utilizando a mesma proporção inibidor:PLA<sub>2</sub> mostraram que esse inibidor foi capaz de reduzir em torno 65% do edema e 70% da atividade miotóxica causada por Lys49-PLA<sub>2</sub>. Em contrapartida, menor ação foi vista para Asp49-PLA<sub>2</sub>: redução de ~25% do edema e ~35% da atividade miotóxica causada por essas toxinas (OLIVEIRA *et al.*, 2008). No entanto, não houve redução significativa da atividade enzimática da CB e esta não foi avaliada nos estudos *in vivo* (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

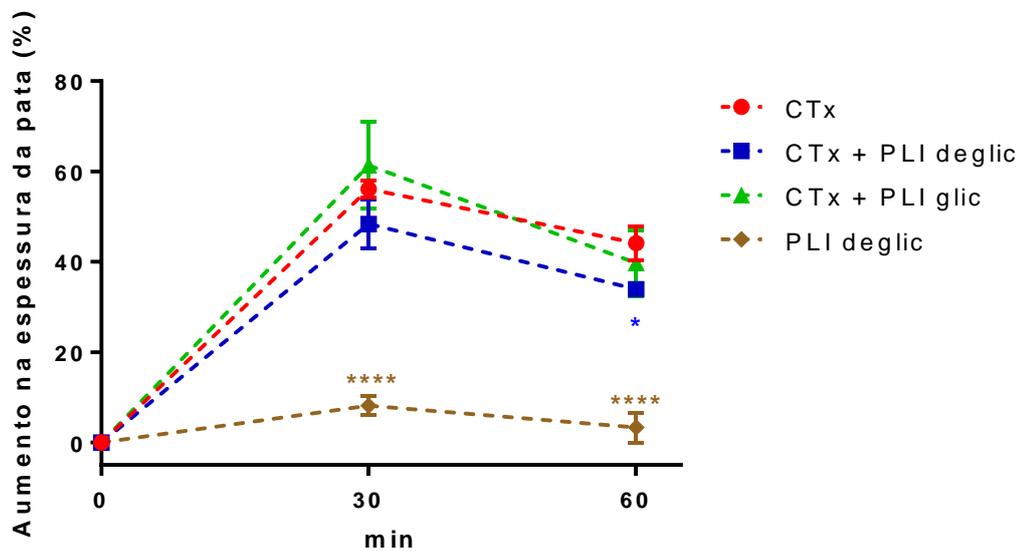
Resultados similares também foram vistos com o BjMIP, um  $\alpha$ -PLI de *B. jararaca* (SOARES *et al.*, 2003). Soares e colaboradores verificaram que o BjMIP apresenta maior inibição sobre Lys49-PLA<sub>2</sub> do que sobre Asp49-PLA<sub>2</sub>. Além disso, BjMIP não inibiu ação miotóxica da CB. Por sua vez, o rBaltMIP, a versão recombinante de um  $\alpha$ -PLI de *B. alternatus*, inibiu de forma semelhante a miotoxicidade e o edema causado pelas Lys49-BthTX-I e Asp49-BThTX-II (SANTOS-FILHO *et al.*, 2016). Entretanto, foi utilizada maior proporção de inibidor: 2:1 (inibidor:toxina). Em um estudo anterior, não houve diferença estatística na miotoxicidade e edema induzidos por Lys49-BthTX-I e Asp49-BThTX-II na presença de rBaltMIP na proporção 1:5 (inibidor:toxina) (SANTOS-FILHO *et al.*, 2014).

Com relação aos  $\gamma$ -PLIs, o Boa $\gamma$ PLI de *Boa constrictor*, serpente popularmente conhecida como jiboia, diminuiu efeitos miotóxicos e edematogênicos de Asp49-PLA<sub>2</sub> de *C. d. terrificus* e Lys49-PLA<sub>2</sub> de *B. jararacussu* (RODRIGUES *et al.*, 2020). A redução foi de ~10% em 30 min de experimentação, mas houve maior redução na área calculada sob a curva do gráfico. Outro  $\gamma$ -PLI, o  $\gamma$ BjPLI de *B. jararaca*, reduziu a atividade enzimática, edematogênica (~30%) e mionecrótica (~50%) da PLA<sub>2</sub> de *C. d. terrificus* (SERINO-SILVA *et al.*, 2018). Entretanto, nesse estudo também é observado que o  $\gamma$ BjPLI, por si só, causou um grande volume de edema assim como o  $\gamma$ CdcPLI de *C. d. collilineatus* (GIMENES *et al.*, 2014), o que não ocorreu com o rCdtPLI2.

Alguns animais fornecidos para o primeiro experimento estavam muito abaixo do peso e, por isso, foram mantidos por 10 dias no biotério para que crescessem e atingissem um peso maior. Sendo assim, optou-se por fazer um novo experimento com esses animais (peso médio

de 26,2 g, variando entre 23-30 g), mas utilizando metade da concentração de CTx-Cdc a fim de se evitar novas mortes dos camundongos.

A Figura 2.38 mostra os resultados dos primeiros 60 min de experimento. Observa-se que houve uma pequena redução (~7%) durante 30 min iniciais no edema induzido pela CTx-Cdc quando esta esteve na presença do inibidor deglicosilado (Figura 2.38). Já na área sob a curva, obteve-se uma redução de ~17%. Esses resultados indicam a possibilidade do rCdtPLI2 deglicosilado apresentar ações *in vivo* contra a atividade da CTx-Cdc, devendo ainda ser repetido com um maior número de animais visto que foi realizada apenas uma avaliação preliminar.



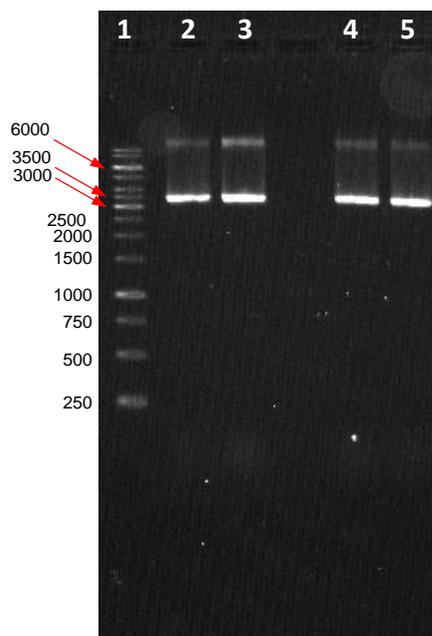
**Figura 2.38 – Experimentação animal 2 da avaliação preliminar *in vivo* da inibição do edema causado pela CTx-Cdc.** Para as amostras em que houve incubação da toxina com o inibidor, seguiu-se a proporção 1:1 (inibidor:toxina). Os resultados foram comparados ao controle positivo de indução de edema ( $6,9 \times 10^{-5}$   $\mu\text{mol}$  de CTx-Cdc) e estão expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão, analisados por two-way ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni (\* $0,05 < p \leq 0,01$ ; \*\*\*\* $p < 0,0001$ ). Abreviações: PLI deglic: PLI deglicosilado pela  $\alpha$ -manosidade; PLI glic: PLI glicosilado.

#### 2.4.18 Propagação do vetor brCdtPLI2\_pET-28a(+) para expressão do CdtPLI2 em *E. coli*

Tendo em vista a interferência da glicosilação na atividade do rCdtPLI2 produzido *P. pastoris*, optou-se por expressar o inibidor de PLA<sub>2</sub> em outro sistema heterólogo: a bactéria *E. coli*. O inibidor expresso nesse sistema será chamado de brCdtPLI2 (br = *bacterial recombinant*) apenas para diferenciação do inibidor produzido em levedura (rCdtPLI2), pois ambos apresentam a mesma estrutura primária.

Aproximadamente 30% dos produtos biofarmacêuticos disponíveis no mercado são provenientes de sistemas bacterianos (OVERTON, 2014). A produção de proteínas recombinantes em sistema de expressão procariótico apresenta como grandes vantagens uma cinética de crescimento muito rápida e um alcance de alta densidade celular nas culturas. Além disso, meios ricos e complexos podem ser feitos rapidamente a partir de componentes baratos e a transformação das células com o DNA exógeno é rápida e fácil (ROSANO; CECCARELLI, 2014).

O gene codificador do brCdtPLI2 foi clonado no vetor pET-28a(+), dando origem ao vetor recombinante brCdtPLI2\_pET-28a(+), produzido pela empresa GenScript. Como foram entregues apenas 4 µg do vetor, células competentes de *E. coli* DH5α foram transformadas apenas para posterior propagação e multiplicação do plasmídeo. O plasmídeo foi extraído e o resultado visualizado através de eletroforese em gel de agarose 1% (Figura 2.39).



**Figura 2.39 – Eletroforese em gel de agarose do vetor brCdtPLI2\_pET-28a(+) após propagação e extração da *E. coli* DH5α.** A corrida foi realizada sob voltagem constante de 90 V. GeneRuler 1 kb DNA Ladder (Thermo Scientific) foi usado como padrão de pares de bases. Abreviação: pb: pares de base. Poços: 1) marcador de pares de bases; 2) brCdtPLI2\_pET-28a(+) (89,8 ng/µL); 3) brCdtPLI2\_pET-28a(+) (89,1 ng/µL); 4) brCdtPLI2\_pET-28a(+) (64,8 ng/µL); e 5) brCdtPLI2\_pET-28a(+) (68 ng/µL).

No total, foram obtidos ~31 µg de brCdtPLI2\_pET-28a(+). O vetor pET-28a(+) apresenta 5,4 kb. Com a inserção do gene que codifica o brCdtPLI2 entre os sítios de restrição das enzimas NcoI e XhoI, o seu tamanho aumentou para 6,2 kb. O vetor brCdtPLI2\_pET-28a(+) apresenta um formato circular fechado e compacto e, por essa razão, migra de uma forma

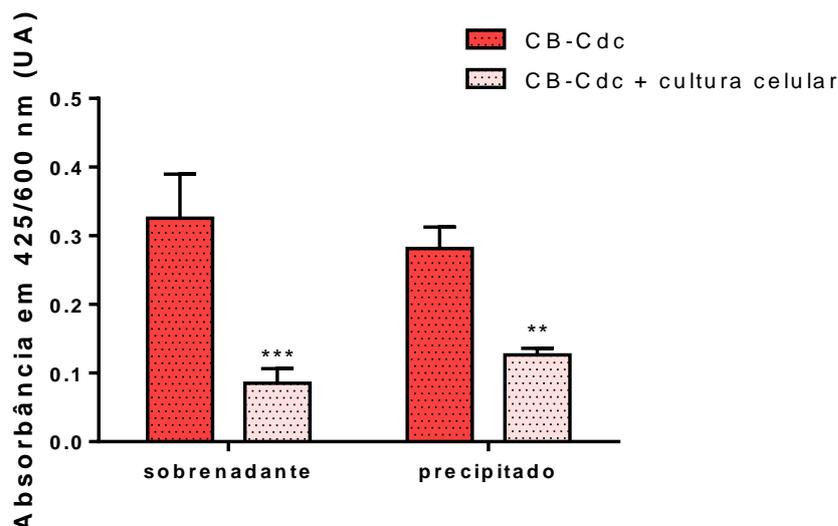
diferente na malha do gel e não apresenta uma correspondência com seu tamanho real (ISHIDO; ISHIKAWA; HIRANO, 2010), como já discutido anteriormente para o vetor pPICZ $\alpha$ A-CdtPLI2. Sendo assim, a eletroforese em gel de agarose (Figura 2.39) mostra um excelente resultado para a extração do vetor clonado, mas não é possível a estimativa de seu tamanho por esse gel.

#### 2.4.19 Expressão e purificação do brCdtPLI2 em *E. coli* BL21(DE3)pLysS

Diferentes linhagens de *E. coli* podem ser utilizadas na expressão de proteínas recombinantes (GOPAL; KUMAR, 2013). A linhagem BL21(DE3) apresenta o gene que codifica a polimerase T7 introduzido no seu genoma e, além disso, foram deletados os genes *Lon* e *OmpT*, que codificam duas proteases que degradam proteínas exógenas à célula (GOPAL; KUMAR, 2013). Por sua vez, a linhagem BL21(DE3)pLysS, além de apresentar os genes anteriores, apresenta também um plasmídeo que codifica a enzima lisozima, inibindo possível atividade residual da RNA polimerase T7 e favorecendo um maior controle da expressão ao prevenir a expressão gotejante (do inglês “*leaky expression*”) (GOPAL; KUMAR, 2013).

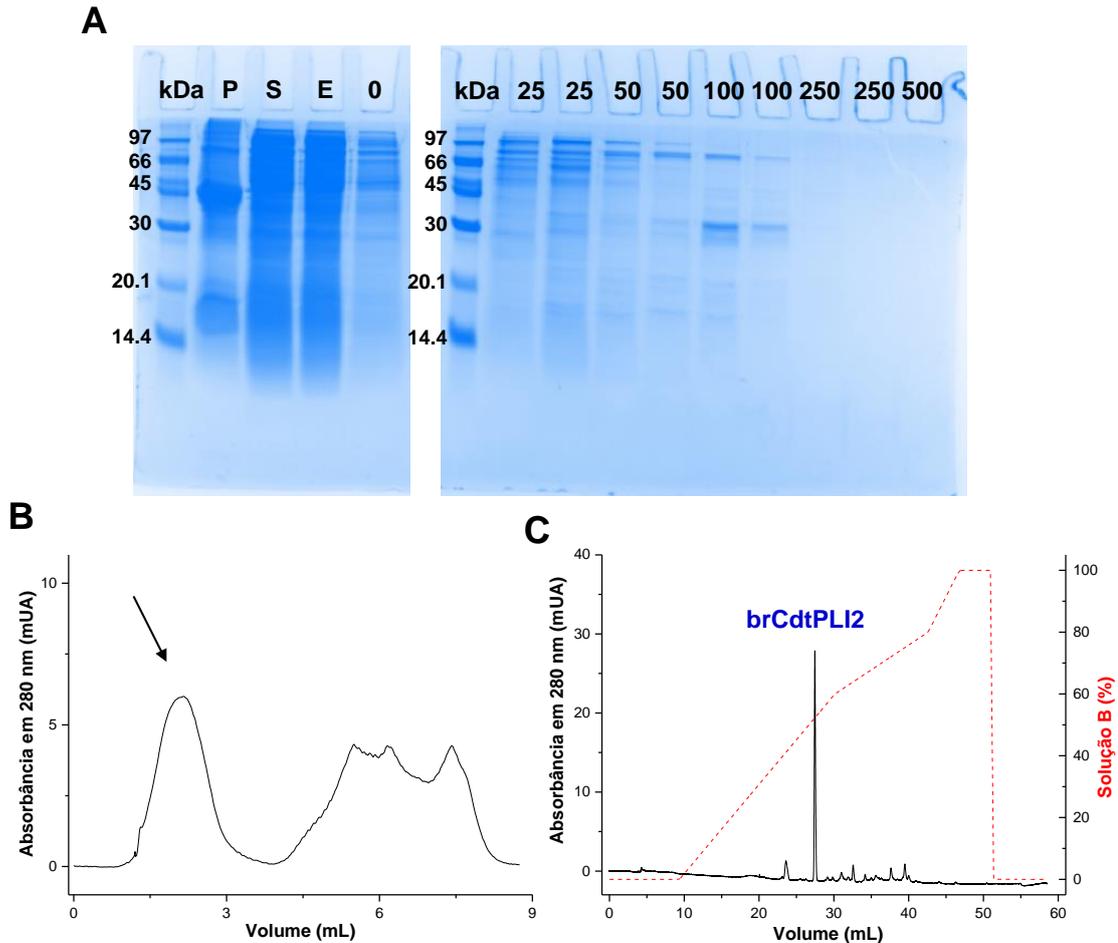
Embora a *E. coli* não realize modificações pós-traducionais como as realizadas por leveduras (DALY; HEARN, 2005), esse fato pode representar uma vantagem na expressão do brCdtPLI2 uma vez que a glicosilação realizada pela *P. pastoris* no rCdtPLI2 interfere em sua atividade, como já discutido anteriormente. A indução da expressão do brCdtPLI2 em sistema bacteriano foi realizada em *E. coli* BL21(DE3)pLysS na presença de 0,5 mM de IPTG durante 6 h e na temperatura de 18 °C.

Alíquotas do precipitado e do sobrenadante obtidos após a lise celular foram submetidos à avaliação de sua atividade inibitória frente a atividade enzimática da CB-Cdc (Figura 2.40). Grande inibição da atividade da CB-Cdc foi vista com ambas as amostras, indicando a presença no inibidor. Inicialmente, optou-se por isolar o inibidor do sobrenadante utilizando o mesmo protocolo de purificação já padronizado para o rCdtPLI2: cromatografia de afinidade em resina de níquel, filtração molecular e cromatografia de fase reversa (Figura 2.41).



**Figura 2.40 – Inibição da atividade fosfolipásica pela cultura celular de *E. coli* BL21(DE3)pLysS.** A CB-Cdc foi incubada com o brCdtPLI2 e o substrato NOB em 37 °C. A absorbância das amostras foi lida em 425 nm, tendo 600 nm como referência após 60 min de incubação. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram comparados ao controle positivo (CB-Cdc) e estão expressos como a média  $\pm$  o desvio padrão, analisados por ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Bonferroni (\*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ).

Na cromatografia de afinidade o inibidor brCdtPLI2 foi eluído com a concentração de 100 mM de imidazol (Figura 2.41A) e essa fração foi, então, submetida à etapa de filtração molecular para retirada do imidazol (Figura 2.41B). A proteína de interesse foi eluída entre 1,5-3 mL. Os picos de absorbância em volumes de eluição superiores a 4,5 mL correspondem a saída do imidazol e outros sais que estavam presentes na amostra. Após a cromatografia de fase reversa (Figura 2.41C), o brCdtPLI2 foi isolado com sucesso. Todavia, após a remoção do solvente, ocorreu a formação de agregados insolúveis do brCdtPLI2 ou sua precipitação, fazendo com que a amostra não ficasse totalmente solúvel quando novamente em solução (dados não mostrados).

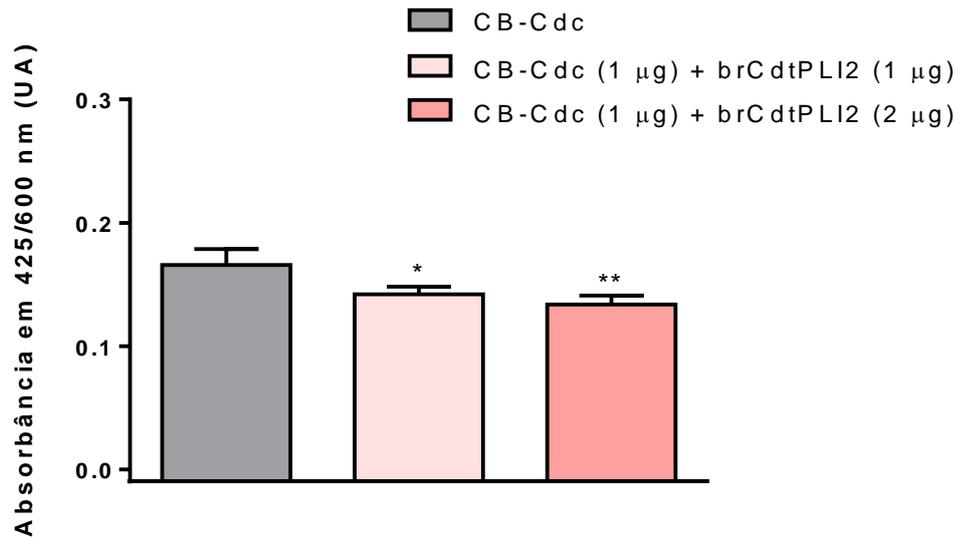


**Figura 2.41 – Purificação do brCdtPLI2.** **A)** Cromatografia de afinidade. SDS-PAGE 13,5% para visualização do resultado foi realizada sob 90 V. Nos poços estão indicadas as concentrações de imidazol para cada gradiente. As bandas de proteínas foram coradas por *Coomassie Brilliant Blue G250*, mas as imagens dos géis foram adquiridas em preto e branco pelo sistema Gel Doc™ EZ Gel Documentation e coloridas artificialmente pelo *software* Image Lab™. **B)** Filtração molecular na coluna *HiTrap™ Desalting* (5 mL, GE Healthcare) da fração contendo o brCdtPLI2. A coluna foi previamente equilibrada com TFA 0,05% e o inibidor eluído nessa mesma solução. **C)** Cromatografia de fase reversa da fração proveniente da filtração molecular (indicada pela seta) e que foi aplicada na coluna *Jupiter® 5µ C4 300 Å* (250 x 4,6 mm, Phenomenex) previamente equilibrada com TFA 0,1%. A eluição das frações seguiu um gradiente de ACN (0-80%) em TFA 0,1%. As etapas **B)** e **C)** foram monitoradas pelo sistema Äkta pure (GE Healthcare) em 280 nm. **Abreviações:** E: efluente da cromatografia; P: precipitado do lisado celular; S: sobrenadante do lisado celular.

Mesmo com a difícil solubilização do brCdtPLI2, sua ação inibitória foi avaliada frente à atividade enzimática da CB-Cdc (Figura 2.42) e verificou-se que o inibidor foi capaz de diminuir a atividade da toxina, muito embora fosse esperado uma redução mais relevante nessa atividade. É possível que o uso de solvente orgânico (acetonitrila) possa causar mudanças na estrutura do inibidor, levando ao prejuízo de sua função.

A partir dos resultados obtidos anteriormente com o rCdtPLI2, observa-se que a glicosilação realizada pela *P. pastoris*, embora possa prejudicar sua atividade, tem importância fundamental na solubilidade do inibidor, favorecendo o seu processo de purificação. A presença

de domínios ricos em leucina confere um centro hidrofóbico adequado para ligações proteína-proteína (BELLA *et al.*, 2008) que poderiam facilitar a formação de agregados. Sendo assim, tem-se uma necessidade de otimizar protocolo de isolamento do brCdtPLI2 para que se evite a remoção do solvente na amostra, favorecendo as interações proteína-proteína e, conseqüentemente, a formação de agregados insolúveis.



**Figura 2.42 – Avaliação da inibição da atividade enzimática da CB-Cdc pelo brCdtPLI2.** A CB-Cdc (1 µg) foi incubada com o brCdtPLI2 (1 ou 2 µg) e o substrato NOB (500 µM) em 37 °C. A absorbância das amostras foi lida em 425 nm, tendo 600 nm como referência, após 120 min de incubação. O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram comparados ao controle positivo (CB-Cdc) e estão expressos como a média ± o desvio padrão, analisados por ANOVA seguido do teste de comparações múltiplas de Dunnett (\* $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ).

### **3. CONCLUSÕES**

---

O avanço das técnicas “ômicas” tem permitido o estudo de peçonhas animais e sua produção. Neste trabalho, foi realizado um estudo aprofundado do venoma da serpente *C. d. terrificus* e atestada a importância da utilização de diferentes bancos de dados para revelar os componentes produzidos na glândula de peçonha. O banco de dados contendo as sequências da análise transcriptômica forneceu uma visão verdadeiramente integrativa da peçonha dessa serpente. No entanto, essa integração está intrinsecamente relacionada à qualidade do banco de dados. Portanto, o uso de um banco de dados geral pode ajudar a completar algumas lacunas no proteoma que não foram cobertos devido à presença de fragmentos de sequências no banco de dados do transcriptoma. Neste estudo também foi verificado que existe uma grande diversidade de transcritos relacionados a componentes de peçonha, mas a serpente parece focar sua produção, pelo menos em um primeiro momento, àqueles componentes envolvidos na morte de sua presa (cadeias ácida e básica da crotoxina). Embora tenha sido revelada a presença de muitas classes de toxinas, a grande maioria da peçonha (~73% do proteoma) corresponde a apenas 7 transcritos identificados na biblioteca de cDNA, e o uso de técnicas mais sensíveis permitiu a descrição de novos componentes em serpentes do gênero *Crotalus*.

Ademais, o inibidor de PLA<sub>2</sub> CdtPLI-2 identificado na glândula de peçonha através da abordagem transcriptômica foi expresso com sucesso em dois sistemas heterólogos: *P. pastoris* e *E. coli*. Sua versão recombinante produzida em levedura (rCdtPLI2) não é reconhecida pelo soro anticrotálico comercial e apresenta várias glicosilações produzidas pela levedura. Estas glicosilações são responsáveis pela baixíssima atividade apresentada por esse inibidor. Porém, com a retirada do açúcar, o rCdtPLI2 deglicosilado se apresenta como uma molécula promissora para ser utilizado como um adjuvante na terapia do envenenamento, pois inibe ações de diferentes PLA<sub>2</sub>s de peçonhas de serpentes brasileiras de interesse médico. Por outro lado, sua versão bacteriana (brCdtPLI2) já é produzido em sua forma ativa, sem glicosilações, mas seu isolamento tem se mostrado uma tarefa desafiadora devido à baixa hidrossolubilidade desse inibidor, embora esse seja um aspecto possível de ser aperfeiçoado futuramente, visando a aplicação farmacológica desse componente.

## **REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

---

ABD EL-AZIZ, T. M.; SOARES, A. G.; STOCKAND, J. D. Advances in venomics: Modern separation techniques and mass spectrometry. **Journal of chromatography - B - Analytical technologies in the biomedical and life**, Amsterdam, v. 1160, p. 122352, Dez. 2020.

AHMAD, M.; HIRZ, M.; PICHLER, H.; SCHWAB, H. Protein expression in *Pichia pastoris*: recent achievements and perspectives for heterologous protein production. **Applied microbiology and biotechnology**, Berlin, v. 98, n. 12, p. 5301-5317, Jun. 2014.

AIRD, S. D. Ophidian envenomation strategies and the role of purines. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 4, p. 335-393, Abr. 2002.

AIRD, S. D. Snake venom dipeptidyl peptidase IV: taxonomic distribution and quantitative variation. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 150, n. 2, p. 222-228, Jun. 2008.

AIRD, S. D.; WATANABE, Y.; VILLAR-BRIONES, A.; ROY, M. C.; TERADA, K.; MIKHEYEV, A. S. Quantitative high-throughput profiling of snake venom gland transcriptomes and proteomes (*Ovophis okinavensis* and *Protobothrops flavoviridis*). **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 790, Nov. 2013.

ALBERTS, B.; JOHNSON, A.; LEWIS, J.; RAFF, M.; ROBERTS, K.; WALTER, P. Manipulação de Proteínas, DNA e RNA. *In: Biologia Molecular da Célula*. 5 ed. Porto Alegre: Artmed, 2010. cap. 8, p. 540-543.

ALBUQUERQUE, P. L.; JACINTO, C. N.; SILVA JUNIOR, G. B.; LIMA, J. B.; VERAS, M. S. B.; DAHER, E. F. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, São Paulo, v. 55, n. 5, p. 295-301, Set-Out. 2013.

AMIN, M. R.; MAMUN, S. M. H.; RASHID, R.; RAHMAN, M.; GHOSE, A.; SHARMIN, S.; RAHMAN, M. R.; FAIZ, M. A. Anti-snake venom: use and adverse reaction in a snake bite study clinic in Bangladesh. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 14, n. 4, p. 660-672, Dez. 2008.

ANAND, P.; GRIGORYAN, A.; BHUIYAN, M. H.; UEBERHEIDE, B.; RUSSEL, V.; QUINOÑEZ, J.; MOY, P.; CHAIT, B. T.; POGET, S. B.; HOLFORD, M. Sample limited characterization of a novel disulfide-rich venom peptide toxin from terebrid marine snail *Terebra variegata*. **PLoS One**, San Francisco, v. 9, n. 4, p. e94122, Abr. 2014.

ANDREWS, S. **FastQC: a quality control tool for high throughput sequence data**. 2010.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ANGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in Bothrops snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothrotoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, Paris, v. 82, n. 8, p. 755-763, Ago. 2000.

---

De acordo com a Associação Brasileira de Normas Técnicas. NBR 6023.

---

ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-type lectin-like proteins from snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 512-519, Set. 2012.

BALDO, C.; JAMORA, C.; YAMANOUYE, N.; ZORN, T. M.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Mechanisms of vascular damage by hemorrhagic snake venom metalloproteinases: tissue distribution and in situ hydrolysis. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 4, n. 6, p. e727, Jun. 2010.

BANDEIRA, I. C. J.; BANDEIRA-LIMA, D.; MELLO, C. P.; PEREIRA, T. P.; MENEZES, R. R. P. B.; SAMPAIO, T. L.; FALCÃO, C. B.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; MARTINS, A. M. C. Antichagasic effect of crotalicidin, a cathelicidin-like viperacidin, found in *Crotalus durissus terrificus* rattlesnake's venom gland. **Parasitology**, London, v. 145, n. 8, p. 1059-1064, Dez. 2017.

BANTSCHIEFF, M.; LEMEER, S.; SAVITSKI, M. M.; KUSTER, B. Quantitative mass spectrometry in proteomics: critical review update from 2007 to the present. **Analytical and bioanalytical chemistry**, Heidelberg, v. 404, n. 4, p. 939-965, Set. 2012.

BEGHINI, D. G.; TOYAMA, M. H.; HYSLOP, S.; SODEK, L. C.; NOVELLO.; MARANGONI, S. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. **Journal of protein chemistry**, New York, v. 19, n. 8, p. 679-684, Nov. 2000.

BELLA, J.; HINDLE, K. L.; MCEWAN, P. A.; LOVELL, S. C. The leucine-rich repeat structure. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 65, n. 15, p. 2307-2333, Ago. 2008.

BERNHEIMER, A. W.; LINDER, R.; WEINSTEIN, S. A.; KIM, K. S. Isolation and characterization of a phospholipase B from venom of Collett's snake, *Pseudechis colletti*. **Toxicon**, Oxford, v. 25, n. 5, p. 547-554, 1987.

BLANKENBERG, D.; GORDON, A.; VON KUSTER, G.; CORAOR, N.; TAYLOR, J.; NEKRUTENKO, A.; GALAXY TEAM. Manipulation of FASTQ data with Galaxy. **Bioinformatics**, Oxford, v. 26, n. 14, p. 1783-1785, Jul. 2010.

BLOCH, K. D.; GROSSMANN, B. Digestion of DNA with restriction endonucleases. **Current protocols in molecular biology**, New York, Chapter 3, p. Unit3.1, Mai. 2001.

BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão **Caderno de Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. 7-16, Jan-Fev. 2003.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; COLOGNA, C. T.; PUCCA, M. B.; BORDON, K. C. F.; AMORIM, F. G.; ANJOLETTE, F. A. P.; CORDEIRO, F. A.; WIEZEL, G. A.; CERNI, F. A.; PINHEIRO-JUNIOR, E. L.; SHIBAO, P. Y. T.; FERREIRA, I. G.; OLIVEIRA, I. S.; CARDOSO, I. A.; ARANTES, E. C. Minor snake venom proteins: Structure, function and potential applications. **Biochimica et biophysica acta. General subjects**, Amsterdam, v. 1861, n. 4, p. 824-838, Abr. 2017.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; CORRÊA-NETTO, C.; SILVA, M. M.; RODRIGUES, R. S.; DE LA TORRE, P.; PÉREZ, A.; SOARES, A. M.; ZINGALI, R. B.; NOGUEIRA, R. A.; RODRIGUES, V. M.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics and antivenomics of *Crotalus durissus* subspecies from Brazil: assessment of geographic variation and its implication on snakebite management. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 73, n. 9, p. 1758-1776, Ago. 2010.

BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, R. S.; FONSECA, F. P.; MENALDO, D. L.; FERREIRA, F. B.; HENRIQUE-SILVA, F.; SOARES, A. M.; HAMAGUCHI, A. RODRIGUES, V. M.; OTAVIANO, A. R.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. *Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile. **Biochimie**, Paris, v. 91, n. 5, p. 586-595, Mai. 2009.

BOLGER, A. M.; LOHSE, M.; USADEL, B. Trimmomatic: a flexible trimmer for Illumina sequence data. **Bioinformatics**, Oxford, v. 30, n. 15, p. 2114-2120, Ago. 2014.

BON, C.; CHANGEUX, J. P.; JENG, T. W.; FRAENKEL-CONRAT, H. Postsynaptic effects of crotoxin and of its isolated subunits. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 99, n. 3, p. 471-481, Set. 1979.

BORDON, K. C.; PERINO, M. G.; GIGLIO, J. R.; ARANTES, E. C. Isolation, enzymatic characterization and antiedematogenic activity of the first reported rattlesnake hyaluronidase from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Biochimie**, Paris, v. 94, n. 12, p. 2740-2748, Dez. 2012.

BORDON, K. C. F.; COLOGNA, C. T.; FORNARI-BALDO, E. C.; PINHEIRO-JÚNIOR, E. L.; CERNI, F. A.; AMORIM, F. G.; ANJOLETTE, F. A. P.; CORDEIRO, F. A.; WIEZEL, G. A.; CARDOSO, I. A.; FERREIRA, I. G.; OLIVEIRA, I. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; PUCCA, M. B.; BALDO, M. A.; ARANTES, E. C. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Frontiers in Pharmacology**, Lausanne, v. 11, p. 1132, Jul. 2020.

BORDON, K. C. F.; WIEZEL, G. A.; AMORIM, F. G.; ARANTES, E. C. Arthropod venom Hyaluronidases: biochemical properties and potential applications in medicine and biotechnology. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 21, n. 43, Out. 2015.

BORDON, K. C. F.; WIEZEL, G. A.; CABRAL, H.; ARANTES, E. C. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 21, n. 26, Ago. 2015.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J. C.; BON, C.; MÉNEZ, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A<sub>2</sub>-like precursor. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1088, n. 3, p. 401-408, Mar. 1991.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância Sanitária. Portaria nº 174, de 11 de novembro de 1996.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Acidente laquético. *In*: Fundação Nacional de Saúde (Ed.). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001a. cap. I, p. 29-31.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde. Soroterapia. *In*: Fundação Nacional de Saúde (Ed.). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2 ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001b. cap. X.

BRASIL. Ministério da Saúde. Acidentes por animais peçonhentos - notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN) - Brasil. 2021. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 18 ago. 2021.

BRAZIL, O. V. Pharmacology of crystalline crotoxin. II. Neuromuscular blocking action. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 33, n. 3, p. 981-992, 1966.

BRETTTHAUER, R. K.; CASTELLINO, F. J. Glycosylation of *Pichia pastoris*-derived proteins. **Biotechnology and applied biochemistry**, San Diego, v. 30, Pt 3, p. 193-200, Dez. 1999.

BROWN, W. M.; DZIEGIELEWSKA, K. M. Friends and relations of the cystatin superfamily - new members and their evolution. **Protein Science**, New York, v. 6, n. 1, p. 5-12, Jan. 1997.

BRYAN-QUIRÓS, W.; FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; LEWIN, M. R.; LOMONTE, B. Neutralizing properties of LY315920 toward snake venom group I and II myotoxic phospholipases A. **Toxicon**, Oxford, v. 157, p. 1-7, Jan. 2019.

BUCHFINK, B.; XIE, C.; HUSON, D. H. Fast and sensitive protein alignment using DIAMOND. **Nature Methods**, New York, v. 12, n. 1, p. 59-60, Jan. 2015.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, Bethesda, v. 50, p. S237-S242, Abr. 2009.

BYCROFT, M.; BATEMAN, A.; CLARKE, J.; HAMILL, S. J.; SANDFORD, R.; THOMAS, R. L.; CHOTHIA, C. The structure of a PKD domain from polycystin-1: implications for polycystic kidney disease. **The EMBO Journal**, Eynsham-Oxford, v. 18, n. 2, p. 297-305, Jan. 1999.

CALDERÓN-CELIS, F.; ENCINAR, J. R.; SANZ-MEDEL, A. Standardization approaches in absolute quantitative proteomics with mass spectrometry. **Mass spectrometry reviews**, New York, v. 37, n. 6, p. 715-737, Nov 2018.

---

CALVETE, J. J. Venomics: digging into the evolution of venomous systems and learning to twist nature to fight pathology. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 72, n. 2, p. 121-126, Mar. 2009.

CALVETE, J. J. Venomics, what else? **Toxicon**, Oxford, v. 60, n. 4, p. 427-433, Set. 2012.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of Mass Spectrometry**, Chichester, v. 42, n. 11, p. 1405-1414, Nov. 2007.

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

CALVETE, J. J.; PÉREZ, A.; LOMONTE, B.; SÁNCHEZ, E. E.; SANZ, L. Snake venomics of *Crotalus tigris*: the minimalist toxin arsenal of the deadliest Nearctic rattlesnake venom. Evolutionary Clues for generating a pan-specific antivenom against crotalid type II venoms [corrected]. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 11, n. 2, p. 1382-1390, Fev. 2012.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CID, P.; DE LA TORRE, P.; FLORES-DÍAZ, M.; SANTOS, M. C.; BORGES, A.; BREMO, A.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; ALAPPE-GIRÓNS, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Snake venomics of the Central American rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* complex points to neurotoxicity as an adaptive paedomorphic trend along *Crotalus* dispersal in South America. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 1, p. 528-544, Jan. 2010.

CAMPOS, P. C.; DE MELO, L. A.; DIAS, G. L. F.; FORTES-DIAS, C. L. Endogenous phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in snakes: a brief overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 37, Dez. 2016.

CAMPOS, P. F.; ANDRADE-SILVA, D.; ZELANIS, A.; PAES LEME, A. F.; ROCHA, M. M. T.; MENEZES, M. C.; SERRANO, S. M. T.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M. Trends in the Evolution of Snake Toxins Underscored by an Integrative Omics Approach to Profile the Venom of the Colubrid *Phalotris mertensi*. **Genome biology and evolution**, Oxford, v. 8, n. 8, p. 2266-2287, Ago. 2016.

CANZIANI, G.; SEKI, C.; VIDAL, J. C. The mechanism of inhibition of phospholipase activity of crotoxin B by crotoxin A. **Toxicon**, Oxford, v. 21, n. 5, p. 663-674, 1983.

CARNEIRO, S. M.; FERNANDES, W.; SANT'ANNA, S. S.; YAMANOUYE, N. Microvesicles in the venom of *Crotalus durissus terrificus* (Serpentes, Viperidae). **Toxicon**, Oxford, v. 49, n. 1, p. 106-110, Jan. 2007.

CARREGARI, V. C.; ROSA-FERNANDES, L.; BALDASSO, P.; BYDLOWSKI, S. P.; MARANGONI, S.; LARSEN, M. R.; PALMISANO, G. Snake Venom Extracellular vesicles (SVEVs) reveal wide molecular and functional proteome diversity. **Scientific reports**, London, v. 8, n. 1, p. 12067, Ago. 2018.

---

CASAI-SILVA, L. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; LEBRUN, I.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Lemnitoxin, the major component of *Micrurus lemniscatus* coral snake venom, is a myotoxic and pro-inflammatory phospholipase A<sub>2</sub>. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 257, p. 60-71, Ago. 2016.

CASEWELL, N. R.; HARRISON, R. A.; WÜSTER, W.; WAGSTAFF, S. C. Comparative venom gland transcriptome surveys of the saw-scaled vipers (Viperidae: *Echis*) reveal substantial intra-family gene diversity and novel venom transcripts. **BMC Genomics**, London, v. 10, p. 564, Nov. 2009.

CASTANHEIRA, L. E.; RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P.; HENRIQUE-SILVA, F.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; RODRIGUES, V. M. Molecular cloning of a hyaluronidase from *Bothrops pauloensis* venom gland. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 25, Jun. 2014.

CASTRO, H. C.; ZINGALI, R. B.; ALBUQUERQUE, M. G.; PUJOL-LUZ, M.; RODRIGUES, C. R. Snake venom thrombin-like enzymes: from reptilase to now. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 61, n. 7-8, p. 843-856, Abr. 2004.

CEBE-SUAREZ, S.; ZEHNDER-FJALLMAN, A.; BALLMER-HOFER, K. The role of VEGF receptors in angiogenesis; complex partnerships. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 63, n. 5, p. 601-615, Mar. 2006.

CEDRO, R. C. A.; MENALDO, D. L.; COSTA, T. R.; ZOCCAL, K. F.; SARTIM, M. A.; SANTOS-FILHO, N. A.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, p. 33, Nov. 2018.

CEREGHINO, J. L.; CREGG, J. M. Heterologous protein expression in the methylotrophic yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Microbiology Reviews**, Amsterdam, v. 24, n. 1, p. 45-66, Jan. 2000.

CHAIM, O. M.; DA SILVEIRA, R. B.; TREVISAN-SILVA, D.; FERRER, V. P.; SADE, Y. B.; BÓIA-FERREIRA, M.; GREMSKI, L. H.; GREMSKI, W.; SENFF-RIBEIRO, A.; TAKAHASHI, H. K.; TOLEDO, M. S.; NADER, H. B.; VEIGA, S. S. Phospholipase-D activity and inflammatory response induced by brown spider dermonecrotic toxin: endothelial cell membrane phospholipids as targets for toxicity. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1811, n. 2, p. 84-96, Fev 2011.

CHEN, R. Q.; JIN, Y.; WU, J. B.; ZHOU, X. D.; LU, Q. M.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. A new protein structure of P-II class snake venom metalloproteinases: it comprises metalloproteinase and disintegrin domains. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 310, n. 1, p. 182-187, Out. 2003.

CHEN, T.; BJOURSON, A. J.; MCCLEAN, S.; ORR, D. F.; O'KANE, E. J.; RAO, P.; SHAW, C. Cloning of maximakinin precursor cDNAs from Chinese toad, *Bombina maxima*, venom. **Peptides**, New York, v. 24, n. 6, p. 853-861, Jun. 2003.

CHENG, Y. C.; YAN, F. J.; CHANG, L. S. Taiwan cobra chymotrypsin inhibitor: cloning, functional expression and gene organization. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1747, n. 2, p. 213-220, Mar. 2005.

CHERR, G. N.; YUDIN, A. I.; OVERSTREET, J. W. The dual functions of GPI-anchored PH-20: hyaluronidase and intracellular signaling. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 20, n. 8, p. 515-525, Dez. 2001.

CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SÁ, J. M.; WARD, R. J. Distinct sites for myotoxic and membrane-damaging activities in the C-terminal region of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>. **The Biochemical Journal**, London, v. 366, Pt 3, p. 971-976, Set. 2002.

CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 38, Jul. 2017.

CIDADE, D. A.; SIMÃO, T. A.; DÁVILA, A. M.; WAGNER, G.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; BON, C.; ZINGALI, R. B.; ALBANO, R. M. *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: analysis of the gene expression pattern. **Toxicon**, Oxford, v. 48, n. 4, p. 437-461, Set. 2006.

CLARE, J. J.; ROMANOS, M. A.; RAYMENT, F. B.; ROWEDDER, J. E.; SMITH, M. A.; PAYNE, M. M.; SREEKRISHNA, K. HENWOOD, A. Production of mouse epidermal growth factor in yeast: high-level secretion using *Pichia pastoris* strains containing multiple gene copies. **Gene**, Amsterdam, v. 105, n. 2, p. 205-212, Set. 1991.

CLEMETSON, K. J. Snakelects (snake C-type lectins) that inhibit or activate platelets by binding to receptors. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 7, p. 1236-1246, Dez. 2010.

COLOGNA, C. T.; RODRIGUES, R. S.; SANTOS, J.; DE PAUW, E.; ARANTES, E. C.; QUINTON, L. Peptidomic investigation of *Neoponera villosa* venom by high-resolution mass spectrometry: seasonal and nesting habitat variations. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 24, n. 6, Jan. 2018.

CORDEIRO, F. A. **Isolamento, caracterização estrutural e bioquímica de uma nova fosfolipase A<sub>2</sub> presente na peçonha de *Lachesis muta rhombeata***. 2013. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2013.

CORDEIRO, F. A. **Expressão heteróloga e caracterização de duas toxinas do escorpião *Tityus serrulatus***. 2017. Tese (Doutorado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

CORDEIRO, F. A.; PERINI, T. G.; BREGGE-SILVA, C.; CREMONEZ, C. M.; RODRIGUES, R. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; BORDON, K. C. F.; SOUZA, D. L. N.; ACHE, D. C.; RODRIGUES, V. M.; SANTOS, W. F.; ROSA, J. C.; ARANTES, E. C. A New Phospholipase A<sub>2</sub> from *Lachesis muta rhombeata*: Purification, Biochemical and Comparative

Characterization with Crotoxin B. **Protein and peptide letters**, Schipol, v. 22, n. 9, p. 816-827, 2015.

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, London, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, Nov. 1988.

COTTO-RIOS, X. M.; BÉKÉS, M.; CHAPMAN, J.; UEBERHEIDE, B.; HUANG, T. T. Deubiquitinases as a signaling target of oxidative stress. **Cell Reports**, Cambridge, v. 2, n. 6, p. 1475-1484, Dez. 2012.

CREGG, J. M. DNA-mediated transformation. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 389, p. 27-42, 2007.

DA SILVA, P. S.; PASSOS, R. M.; WAISBERG, D. R.; PARK, M. V. Serum sickness and severe acute renal failure after rabbit antithymocyte globulin treatment in aplastic anemia: a case report. **Journal of pediatric hematology / oncology**, New York, v. 33, n. 1, p. 43-46, Jan. 2011.

DA SILVA-JÚNIOR, L. N.; ABREU, L. S.; RODRIGUES, C. F. B.; GALIZIO, N. D. C.; AGUIAR, W. S.; SERINO-SILVA, C.; SANTOS, V. S.; COSTA, I. A.; OLIVEIRA, L. V. F.; SANT'ANNA, S. S.; GREGO, K. F.; TANAKA-AZEVEDO, A. M.; RODRIGUES, L. N. S.; MORAIS-ZANI, K. Geographic variation of individual venom profile of *Crotalus durissus* snakes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, e20200016, Ago. 2020.

DAI, M.; YU, C.; FANG, T.; FU, L.; WANG, J.; ZHANG, J.; REN, J.; XU, J.; ZHANG, X.; CHEN, W. Identification and Functional Characterization of Glycosylation of Recombinant Human Platelet-Derived Growth Factor-BB in *Pichia pastoris*. **PLoS One**, San Francisco, v. 10, n. 12, p. e0145419, Dez. 2015.

DALY, R.; HEARN, M. T. Expression of heterologous proteins in *Pichia pastoris*: a useful experimental tool in protein engineering and production. **Journal of molecular recognition**, London, v. 18, n. 2, p. 119-138, 2005 Mar-Abr. 2005.

DAMICO, D. C. S.; HOFLING, M. A. D.; CINTRA, M.; LEONARDO, M. B.; CALGAROTTO, A. K.; SILVA, S. L.; MARANGONI, S. Pharmacological study of edema and myonecrosis in mice induced by venom of the bushmaster snake (*Lachesis muta muta*) and its basic Asp49 Phospholipase A<sub>2</sub> (LmTX-I). **The Protein Journal**, Dordrecht, v. 27, n. 6, p. 384-391, Set. 2008.

DE OLIVEIRA, N. G.; CARDOSO, M.; FRANCO, O. L. Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 70, n. 24, p. 4645-4658, Dez. 2013.

DENNIS, E. A. The growing phospholipase A<sub>2</sub> superfamily of signal transduction enzymes. **Trends in biochemical sciences**, Cambridge, v. 22, n. 1, p. 1-2, Jan. 1997.

DESPREAUX, C. W.; MANNING, R. F. The *dacA* gene of *Bacillus stearothermophilus* coding for D-alanine carboxypeptidase: cloning, structure and expression in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Gene**, Amsterdam, v. 131, n. 1, p. 35-41, Set. 1993.

DHANANJAYA, B. L.; D SOUZA, C. J. An overview on nucleases (DNase, RNase, and phosphodiesterase) in snake venoms. **Biochemistry (Mosc)**, Moscow, v. 75, n. 1, p. 1-6, Jan. 2010.

DOERNER, K. C.; WHITE, B. A. Detection of glycoproteins separated by nondenaturing polyacrylamide gel electrophoresis using the periodic acid-Schiff stain. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 187, n. 1, p. 147-150, Mai. 1990.

DOERY, H. M.; PEARSON, J. E. Phospholipase B in snake venoms and bee venom. **The Biochemical journal**, London, v. 92, n. 3, p. 599-602, Set. 1964.

DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **Journal of Structural Biology**, Orlando, v. 167, n. 2, p. 106-116, Ago. 2009.

DOS SANTOS, M. L.; FAGUNDES, F. H.; TEIXEIRA, B. R.; TOYAMA, M. H.; APARICIO, R. Purification and preliminary crystallographic analysis of a new Lys49-PLA<sub>2</sub> from *B. Jararacussu*. **Internation Journal of Molecular Sciences**, Basel, v. 9, n. 5, p. 736-750, Mai. 2008.

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Reptile C-type lectins. *In*: MACKESSY, S. P. (Ed.). **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 18, p. 359-375.

DUNN, R. D.; BROADY, K. W. Snake inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1533, n. 1, p. 29-37, Ago. 2001.

EARL, S. T.; BIRRELL, G. W.; WALLIS, T. P.; ST PIERRE, L. D.; MASCI, P. P.; JERSEY, J.; GORMAN, J. J.; LAVIN, M. F. Post-translational modification accounts for the presence of varied forms of nerve growth factor in Australian elapid snake venoms. **Proteomics**, Weinheim, v. 6, n. 24, p. 6554-6565, Dez. 2006.

EDMAN, P.; BEGG, G. A PROTEIN SEQUENATOR. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 1, n. 1, p. 80-&, 1967.

EINHOFF, W.; RÜDIGER, H. The alpha-mannosidase from *Canavalia ensiformis* seeds: chemical and kinetic properties and action on animal lymphocytes. **Biological chemistry hoppe-seyler**, Berlin, v. 369, n. 3, p. 165-169, Mar. 1988.

ESCOUBAS, P.; KING, G. F. Venomics as a drug discovery platform. **Expert reviews of proteomics**, online, v. 6, n. 3, p. 221-224, Jun. 2009.

ESCOUBAS, P.; QUINTON, L.; NICHOLSON, G. M. Venomics: unravelling the complexity of animal venoms with mass spectrometry. **Journal of mass spectrometry**, v. 43, n. 3, p. 279-295, Mar. 2008.

ESTEVIÃO-COSTA, M. I.; FERNANDES, C. A.; MUDADU, M. E. A.; FRANCO, G. R.; FONTES, M. R. M.; FORTES-DIAS, C. L. Structural and evolutionary insights into endogenous alpha-phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors of Latin American pit vipers. **Toxicon**, Oxford, v. 112, p. 35-44, Mar. 2016.

FALCAO, C. B.; DE LA TORRE, B. G.; PÉREZ-PEINADO, C.; BARRON, A. E.; ANDREU, D.; RÁDIS-BAPTISTA, G. Viperidins: a novel family of cathelicidin-related peptides from the venom gland of South American pit vipers. **Amino Acids**, Wien, v. 46, n. 11, p. 2561-2571, Nov. 2014.

FALCAO, C. B.; PÉREZ-PEINADO, C.; DE LA TORRE, B. G.; MAYOL, X.; ZAMORA-CARRERAS, H.; JIMÉNEZ, M. A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; ANDREU, D. Structural Dissection of Crotalicidin, a Rattlesnake Venom Cathelicidin, Retrieves a Fragment with Antimicrobial and Antitumor Activity. **Journal of medicinal chemistry**, Washington, v. 58, n. 21, p. 8553-8563, Nov. 2015.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, Oxford, v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.

FAURE, G.; CHOUMET, V.; BOUCHIER, C.; CAMOIN, L.; GUILLAUME, J. L.; MONEGIER, B.; VUILHORGNE, M.; BON, C. The origin of the diversity of crotoxin isoforms in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 223, n. 1, p. 161-164, Jul. 1994.

FAURE, G.; GUILLAUME, J. L.; CAMOIN, L.; SALIOU, B.; BON, C. Multiplicity of acidic subunit isoforms of crotoxin, the phospholipase A<sub>2</sub> neurotoxin from *Crotalus durissus terrificus* venom, results from posttranslational modifications. **Biochemistry**, Washington, v. 30, n. 32, p. 8074-8083, Ago. 1991.

FAURE, G.; HARVEY, A. L.; THOMSON, E.; SALIOU, B.; RADVANYI, F.; BON, C. Comparison of crotoxin isoforms reveals that stability of the complex plays a major role in its pharmacological action. **European journal of biochemistry**, Berlin, v. 214, n. 2, p. 491-496, Jun. 1993.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric  $\beta$ -neurotoxin. **Journal of Molecular Biology**, Amsterdam, v. 412, n. 2, p. 176-191, Set. 2011.

FERNANDES, C. A.; BORGES, R. J.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>-like proteins from viperid snake venoms. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1844, n. 12, p. 2265-2276, Dez. 2014.

FERNANDES, T. A.; AGUIAR, C. N.; DAHER, E. D. F. Envenenamento Crotálico: epidemiologia, insuficiência renal aguda e outras manifestações clínicas. **Revista Eletrônica Pesquisa Médica**, Fortaleza, v. 2, n. 2, p. 10, 2008.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; SANZ, L.; LOMONTE, B. Characterization of a novel snake venom component: Kazal-type inhibitor-like protein from the arboreal pitviper *Bothriechis schlegelii*. **Biochimie**, Paris, v. 125, p. 83-90, Mar. 2016.

FERREIRA, I. G. **Caracterização estrutural e funcional de um fator de crescimento endotelial vascular, VEGF, da peçonha da serpente *Crotalus durissus collilineatus***. 2017. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2017.

FIELDS, P. A.; DONG, Y.; MENG, X.; SOMERO, G. N. Adaptations of protein structure and function to temperature: there is more than one way to 'skin a cat'. **Journal of experimental biology**, London, v. 218, Pt 12, p. 1801-1811, Jun. 2015.

FORTES-DIAS, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A<sub>2</sub> in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 5, p. 481-484, Mai 2002.

FORTES-DIAS, C. L.; FERNANDES, C. A. H.; ORTOLANI, P. L.; CAMPOS, P. C.; MELO, L. A.; FELICORI, L. F.; FONTES, M. R. M. Identification, description and structural analysis of beta phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors (sbβPLIs) from Latin American pit vipers indicate a binding site region for basic snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon: X**, London, v. 2, 100009, Fev. 2019.

FORTES-DIAS, C. L.; FONSECA, B. C.; KOCHVA, E.; DINIZ, C. R. Purification and properties of an antivenom factor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, Oxford, v. 29, n. 8, p. 997-1008, 1991.

FORTES-DIAS, C. L.; LIN, Y.; EWELL, J.; DINIZ, C. R.; LIU, T. Y. A phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 269, n. 22, p. 15646-15651, Jun. 1994.

FORTES-DIAS, C. L.; MACEDO, D. H. F.; BARBOSA, R. P.; SOUZA-SILVA, G.; ORTOLANI, P. L. Identification and characterization of the first endogenous phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from a non-venomous tropical snake, *Boa constrictor* (Serpentes: Boidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 26, p. e20190044, Mar. 2020.

FORTES-DIAS, C. L.; ORTOLANI, P. L.; FERNANDES, C. A. H.; LOBO, K. R.; MELO, L. A.; BORGES, M. H.; PAZIN, W. M.; OLIVEIRA NETO, M. FERNANDEZ, R. M.; FONTES, M. R. M. Insights on the structure of native CNF, an endogenous phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus terrificus*, the South American rattlesnake. **Biochimica et biophysica acta. Proteins and proteomics**, Amsterdam, v. 1844, n. 9, p. 1569-1579, Set. 2014.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **The FEBS Journal**, Oxford, v. 275, n. 12, p. 3016-3030, Jun. 2008.

FROBERT, Y.; CRÉMINON, C.; COUSIN, X.; RÉMY, M. H.; CHATEL, J. M.; BON, S.; BON, C.; GRASSI, J. Acetylcholinesterases from Elapidae snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. **Biochimica et biophysica acta**, Amsterdam, v. 1339, n. 2, p. 253-267, Mai. 1997.

FRYXELL, K. B.; O'DONOGHUE, K.; GRAEFF, R. M.; LEE, H. C.; BRANTON, W. D. Functional expression of soluble forms of human CD38 in *Escherichia coli* and *Pichia pastoris*. **Protein expression and purification**, San Diego, v. 6, n. 3, p. 329-336, Jun. 1995.

FU, J.; MURPHY, K. A.; ZHOU, M.; LI, Y. H.; LAM, V. H.; TABULOC, C. A.; CHIU, J. C.; LIU, Y. Codon usage affects the structure and function of the *Drosophila* circadian clock protein PERIOD. **Genes and Development**, New York, v. 30, n. 15, p. 1761-1775, Ago. 2016.

FUSCO, L. S.; RODRÍGUEZ, J. P.; TORRES-HUACO, F.; HUANCAHUIRE-VEGA, S.; TEIBLER, P.; ACOSTA, O.; MARANGONI, S.; PONCE-SOTO, L. A.; LEIVA, L. C. P9a(Cdt-PLA2) from *Crotalus durissus terrificus* as good immunogen to be employed in the production of crotalic anti-PLA<sub>2</sub> IgG. **Toxicology Letters**, Amsterdam, v. 238, n. 1, p. 7-16, Out. 2015.

GAO, J. F.; QU, Y. F.; ZHANG, X. Q.; HE, Y.; JI, X. Neonate-to-adult transition of snake venomics in the short-tailed pit viper, *Gloydius brevicaudus*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 84, p. 148-157, Jun. 2013.

GASTEIGER, E.; HOOGLAND, C.; GATTIKER, A.; DUVAUD, S. WILKINS, M. R.; APPEL, R. D.; BAIROCH, A. Protein Identification and Analysis Tools on the ExPASy Server. In: WALKER, J. M. (Ed.). **The Proteomics Protocols Handbook**: Humana Press, 2005. p. 571-607.

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

GEORGIEVA, D.; OHLER, M.; SEIFERT, J.; VON BERGEN, M.; ARNI, R. A.; GENOV, N.; BETZEL, C. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus*--correlation with pharmacological activities. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 5, p. 2302-2316, Mai. 2010.

GHEZELLOU, P.; ALBUQUERQUE, W.; GARIKAPATI, V.; CASEWELL, N. R.; KAZEMI, S. M.; GHASSEMPOUR, A.; SPENGLER, B. Integrating Top-Down and Bottom-Up Mass Spectrometric Strategies for Proteomic Profiling of Iranian Saw-Scaled Viper, *Echis carinatus sochureki*, Venom. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 20, n. 1, p. 895-908, Jan. 2021.

GIMENES, S. N.; FERREIRA, F. B.; SILVEIRA, A. C.; RODRIGUES, R. S.; YONEYAMA, K. A. G.; SANTOS, J. I.; FONTES, M. R. M.; BRITES, V. L. C.; SANTOS, A. L. Q.; BORGES, M. H.; LOPES, D. S.; RODRIGUES, V. M. Isolation and biochemical characterization of a  $\gamma$ -type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, Oxford, v. 81, p. 58-66, Abr. 2014.

GNANESH KUMAR, B. S.; POHLENTZ, G.; SCHULTE, M.; MORMANN, M.; KUMAR, N. S. Jack bean  $\alpha$ -mannosidase: amino acid sequencing and N-glycosylation analysis of a valuable glycomics tool. **Glycobiology**, Oxford, v. 24, n. 3, p. 252-261, Mar. 2014.

GOPAL, G. J.; KUMAR, A. Strategies for the production of recombinant protein in *Escherichia coli*. **The Protein Journal**, Dordrecht, v. 32, n. 6, p. 419-425, Ago. 2013.

GRABHERR, M. G.; HAAS, B. J.; YASSOUR, M.; LEVIN, J. Z.; THOMPSON, D. A.; AMIT, I.; ADICONIS, X.; FAN, L.; RAYCHOWDHURY, R.; ZENG, Q.; CHEN, Z.; MAUCELI, E.; HACOHEN, N.; GNIRKE, A.; RHIND, N.; DI PALMA, F.; BIRREN, B. W.; NUSBAUM, C.; LINDBLAD-TOH, K.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. Full-length transcriptome assembly from RNA-Seq data without a reference genome. **Nature Biotechnology**, New York, v. 29, n. 7, p. 644-52, Mai. 2011.

GUO, J.; CHEN, S.; HUANG, C.; CHEN, L.; STUDHOLME, D. J.; ZHAO, S.; YU, L. MANSC: a seven-cysteine-containing domain present in animal membrane and extracellular proteins. **Trends in biochemical sciences**, Cambridge, v. 29, n. 4, p. 172-174, Abr. 2004.

GUO, W.; GONZÁLEZ-CANDELAS, L.; KOLATTUKUDY, P. E. Cloning of a new pectate lyase gene *pelC* from *Fusarium solani* f. sp. *pisi* (*Nectria haematococca*, mating type VI) and characterization of the gene product expressed in *Pichia pastoris*. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 323, n. 2, p. 352-360, Nov. 1995.

GUTIERREZ, J. M.; BURNOUF, T.; HARRISON, R. A.; CALVETE, J. J.; KUCH, U.; WARRELL, D. A.; WILLIAMS, D. J. A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. **Bulletin of the World Health Organization**, Geneva, v. 92, n. 7, p. 526-532, Jul. 2014.

GUTIERREZ, J. M.; LEON, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: The road ahead. **Biologicals**, London, v. 39, n. 3, p. 129-142, Mai. 2011.

GUTIERREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A<sub>2</sub>: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. **Toxicon**, Oxford, v. 51, n. 1, p. 80-92, Jan. 2008.

GUTIÉRREZ, J. M. Novel alternatives for improving the therapy of snakebite envenomings. *In: 20th World Congress of the International Society on Toxinology, 2019, Buenos Aires.* **Toxicon**, Oxford, v. 177, sup. 1, p. S20-S21, Abr. 2020.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Memórias do Instituto Butantan**, São Paulo, v. 51, n. 4, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, Nov. 1995.

HAAS, B. J.; PAPANICOLAOU, A.; YASSOUR, M.; GRABHERR, M.; BLOOD, P. D.; BOWDEN, J.; COUGER, M. B.; ECCLES, D.; LI, B.; LIEBER, M.; MACMANES, M. D.; OTT, M.; ORVIS, J.; POCHET, N.; STROZZI, F.; WEEKS, N.; WESTERMAN, R.; WILLIAM, T.; DEWEY, C. N.; HENSCHL, R.; LEDUC, R. D.; FRIEDMAN, N.; REGEV, A. *De novo* transcript sequence reconstruction from RNA-seq using the Trinity platform for reference generation and analysis. **Nature Protocols**, London, v. 8, n. 8, p. 1494-1512, Ago. 2013.

HABERMANN, E.; WALSCH, P.; BREITHAUPT, H. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. II. Possible interrelationships between toxicity and organ distribution of phospholipase A, crotopotin and their combination. **Naunyn - Schmiedeberg's Archives of Pharmacology**, Berlin, v. 273, n. 4, p. 313-330, 1972.

HAN, Y.; MA, B.; ZHANG, K. SPIDER: software for protein identification from sequence tags with de novo sequencing error. **Journal of bioinformatics and computational biology**, London, v. 3, n. 3, p. 697-716, Jun. 2005.

HASTE ANDERSEN, P.; NIELSEN, M.; LUND, O. Prediction of residues in discontinuous B-cell epitopes using protein 3D structures. **Protein Science**, New York, v. 15, n. 11, p. 2558-2567, Nov. 2006.

HUI WEN, F.; MONTEIRO, W. M.; MOURA DA SILVA, A. M.; TAMBOURGI, D. V.; SILVA, I. M.; SAMPAIO, V. S.; SANTOS, M. C.; SACHETT, J.; FERREIRA, L. C. L.; KALIL, J.; LACERDA, M. Snakebites and scorpion stings in the Brazilian Amazon: identifying research priorities for a largely neglected problem. **PLoS neglected tropical diseases**, San Francisco, v. 9, n. 5, p. e0003701, Mai. 2015.

INAGAKI, H.; KIMOTO, H.; YAMAUCHI, Y.; TORIBA, M.; KUBO, T. Functional characterization of Kunitz-type protease inhibitor Pr-mulgins identified from New Guinean *Pseudechis australis*. **Toxicon**, Oxford, v. 59, n. 1, p. 74-80, Jan. 2012.

INOUE, S.; KOGAKI, H.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORI-SATOH, T. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. Sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 266, n. 2, p. 1001-1007, Jan. 1991.

INSTITUTO BUTANTAN. **Produtos produzidos no Instituto Butantan**. Disponível em: <http://www.butantan.gov.br/producao/produtos/Paginas/default.aspx>. Acesso em: 11 jun. 2018.

INVITROGEN. **EasySelect™ Pichia Expression Kit**. User manual. 86 p. 2010.

ISHIDO, T.; ISHIKAWA, M.; HIRANO, K. Analysis of supercoiled DNA by agarose gel electrophoresis using low-conducting sodium threonine medium. **Analytical Biochemistry**, New York, v. 400, n. 1, p. 148-150, Mai. 2010.

- JOUKOV, V.; PAJUSOLA, K.; KAIPAINEN, A.; CHILOV, D.; LAHTINEN, I.; KUKK, E.; SAKSELA, O.; KALKKINEN, N.; ALITALO, K. A novel vascular endothelial growth factor, VEGF-C, is a ligand for the Flt4 (VEGFR-3) and KDR (VEGFR-2) receptor tyrosine kinases. **The EMBO Journal**, Eynsham-Oxford, v. 15, n. 7, p. 1751, Abr. 1996.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; BASTOS, C. M.; HO, P. L.; LUNA, M. S.; YAMANOUE, N.; CASEWELL, N. R. Venom-related transcripts from *Bothrops jararaca* tissues provide novel molecular insights into the production and evolution of snake venom. **Molecular biology and evolution**, New York, v. 32, n. 3, p. 754-766, Mar. 2015.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; CAMPOS, P. F.; CHING, A. T.; MACKESSY, S. P. Colubrid Venom Composition: An -Omics Perspective. **Toxins**, Basel, v. 8, n. 8, Jul. 2016.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; CHING, A. T.; CARVALHO, E.; FARIA, F.; NISHIYAMA JR, M. Y.; HO, P. L.; DINIZ, M. R. V. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics**, Austin, v. 173, n. 2, p. 877-889, Jun. 2006.
- 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**, Weinheim, v. 4, n. 2, p. 327-338, Fev. 2004.
- KAAS, Q.; CRAIK, D. J. Bioinformatics-Aided Venomomics. **Toxins**, Basel, v. 7, n. 6, p. 2159-2187, Jun. 2015.
- KAVRAN, J. M.; LEAHY, D. J. Silver staining of SDS-polyacrylamide gel. **Methods in Enzymology**, New York, v. 541, p. 169-176, 2014.
- KETELHUT, D. F.; DE MELLO, M. H.; VERONESE, E. L.; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V.. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A<sub>2</sub> isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, Paris, v. 85, n. 10, p. 983-991, Out. 2003.
- KIM, D.; PERTEA, G.; TRAPNELL, C.; PIMENTEL, H.; KELLEY, R.; SALZBERG, S. L. TopHat2: accurate alignment of transcriptomes in the presence of insertions, deletions and gene fusions. **Genome Biology**, London, v. 14, n. 4, p. R36, Abr. 2013.
- KINI, R. M.; DOLEY, R. Structure, function and evolution of three-finger toxins: mini proteins with multiple targets. **Toxicon**, Oxford, v. 56, n. 6, p. 855-867, Nov. 2010.
- KINKAWA, K.; SHIRAI, R.; WATANABE, S.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Up-regulation of the expressions of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A<sub>2</sub>. **Biochemical and biophysical research communications**, San Diego, v. 395, n. 3, p. 377-381, Mai. 2010.
- KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon**, Oxford, v. 24, n. 6, p. 575-583, 1986.

KREGAR, I.; LOCNIKAR, P.; POPOVIĆ, T.; SUHAR, A.; LAH, T.; RITONJA, A.; GUBENSEK, F.; TURK, V. Bovine intracellular cysteine proteinases. **Acta biologica et medica Germanica**, Berlin, v. 40, n. 10-11, p. 1433-1438, 1981.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, London, v. 227, n. 5259, p. 680-685, Ago. 1970.

LALLOO, D. G.; THEAKSTON, R. D. G. Snake antivenoms. **Journal of toxicology. Clinical toxicology**, New York, v. 41, n. 3, p. 277-290, 2003.

LAUSTSEN, A. H. Guiding recombinant antivenom development by omics technologies. **New Biotechnology**, Amsterdam, v. 45, p. 19-27, Out. 2018.

LETUNIC, I.; DOERKS, T.; BORK, P. SMART: recent updates, new developments and status in 2015. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, n. Database issue, p. D257-260, Jan. 2015.

LEÓN, G.; SEGURA, A.; HERRERA, M.; OTERO, R.; FRANÇA, F. O. S.; BARBARO, K. C.; CARDOSO, J. L. C.; WEN, F. H.; MEDEIROS, C. R.; PRADO, J. C. L.; MALAQUE, C. M. S.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Human heterophilic antibodies against equine immunoglobulins: assessment of their role in the early adverse reactions to antivenom administration. **Transactions of the Royal Society of Tropical Medicine and Hygiene**, London, v. 102, n. 11, p. 1115-1119, Nov. 2008.

LI, Y. T. Presence of alpha-D-mannosidic linkage in glycoproteins. Liberation of d-mannose from various glycoproteins by alpha-mannosidase isolated from jack bean meal. **Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 241, n. 4, p. 1010-1012, Fev. 1966.

LIMA, R. M.; ESTEVAO-COSTA, M. I.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; DINIZ, M. R. V.; FORTES-DIAS, C. L. Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors (beta PLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. **Toxicon**, Oxford, v. 57, n. 1, p. 172-175, Jan. 2011.

LIN CEREGHINO, G. P.; LIN CEREGHINO, J.; SUNGA, A. J.; JOHNSON, M. A.; LIM, M.; GLEESON, M. A.; CREGG, J. M. New selectable marker/auxotrophic host strain combinations for molecular genetic manipulation of *Pichia pastoris*. **Gene**, Amsterdam, 263, n. 1-2, p. 159-169, Jan. 2001.

LIZANO, S.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; FOX, J. W.; LAMBEAU, G.; LASDUNSKI, M.; GUTIÉRREZ, J. M. Two phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. **The Biochemical Journal**, London, v. 346, Pt 3, p. 631-639, Mar. 2000.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, Oxford, v. 42, n. 8, p. 963-977, Dez. 2003.

LIZANO, S.; LOMONTE, B.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of

---

the snake *Bothrops asper*. **The Biochemical Journal**, London, v. 326, Pt 3, p. 853-859, Set. 1997.

LOMONTE, B.; CALVETE, J. J. Strategies in 'snake venomics' aiming at an integrative view of compositional, functional, and immunological characteristics of venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 26, 2017.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A<sub>2</sub> from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? **Acta chimica Slovenica**, Ljubljana, v. 58, n. 4, p. 647-659, Dez. 2011.

LOVECCHIO, F.; KLEMENS, J.; ROUNDY, E. B.; KLEMENS, A. Serum sickness following administration of antivenin (Crotalidae) polyvalent in 181 cases of presumed rattlesnake envenomation. **Wilderness & Environmental Medicine**, New York, v. 14, n. 4, p. 220-221, Winter 2003.

LUIZ, M. B.; PEREIRA, S. S.; PRADO, N. D. R.; GONÇALVES, N. R.; KAYANO, A. M.; MOREIRA-DILL, L. S.; SOBRINHO, J. C.; ZANCHI, F. B.; FULY, A. L.; FERNANDES, C. F.; ZULIANI, J. P.; SOARES, A. M.; STÁBELI, R. G.; FERNANDES, C. F. C. Camelid Single-Domain Antibodies (VHHs) against Crotoxin: A Basis for Developing Modular Building Blocks for the Enhancement of Treatment or Diagnosis of Crotalic Envenoming. **Toxins**, Basel, v. 10, n. 4, Mar. 2018.

LUNA, M. S.; VALENTE, R. H.; PERALES, J.; VIEIRA, M. L.; YAMANOUE, N. Activation of *Bothrops jararaca* snake venom gland and venom production: a proteomic approach. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 94, p. 460-472, Dez. 2013.

MACAULEY-PATRICK, S.; FAZENDA, M. L.; MCNEIL, B.; HARVEY, L. M. Heterologous protein production using the *Pichia pastoris* expression system. **Yeast**, Chichester, v. 22, n. 4, p. 249-270, Mar. 2005.

MARCHI-SALVADOR, D. P.; CORRÊA, L. C.; MAGRO, A. J.; OLIVEIRA, C. Z.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. Insights into the role of oligomeric state on the biological activities of crotoxin: crystal structure of a tetrameric phospholipase A<sub>2</sub> formed by two isoforms of crotoxin B from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Proteins**, New York, v. 72, n. 3, p. 883-891, Ago. 2008.

MARGRES, M. J.; ARONOW, K.; LOYACANO, J.; ROKYTA, D. R. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. **BMC Genomics**, London, v. 14, p. 531, Ago. 2013.

MARGRES, M. J.; MCGIVERN, J. J.; WRAY, K. P.; SEAVY, M.; CALVIN, K.; ROKYTA, D. R. Linking the transcriptome and proteome to characterize the venom of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 96, p. 145-158, Jan. 2014.

MASHIKO, H.; TAKAHASHI, H. Cysteine proteinase inhibitors in elapid and hydrophiid snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 40, n. 9, p. 1275-1281, Set. 2002.

---

MCGETTIGAN, P. A. Transcriptomics in the RNA-seq era. **Current Opinion in Chemical Biology**, London, v. 17, n. 1, p. 4-11, Fev. 2013.

MELANI, R. D.; ARAUJO, G. D. T.; CARVALHO, P. C.; GOTO, L.; NOGUEIRA, F. C. S.; JUNQUEIRA, M.; DOMONT, G. B. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venom of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **EuPA Open Proteomics**, Amsterdam, v. 8, p. 144-156, Set. 2015.

MELANI, R. D.; NOGUEIRA, F. C. S.; DOMONT, G. B. It is time for top-down venomics. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 23, n. 44, 2017.

MELANI, R. D.; SKINNER, O. S.; FORNELLI, L.; DOMONT, G. B.; COMPTON, P. D.; KELLEHER, N. L. Mapping Proteoforms and Protein Complexes From King Cobra Venom Using Both Denaturing and Native Top-down Proteomics. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 15, n. 7, p. 2423-2434, Jul. 2016.

MERRY, T.; ASTRUTSOVA, S. Chemical and enzymatic release of glycans from glycoproteins. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 213, p. 27-40, 2003.

MILJANICH, G. P. Ziconotide: neuronal calcium channel blocker for treating severe chronic pain. **Current Medicinal Chemistry**, Schipol, v. 11, n. 23, p. 3029-3040, Dez. 2004.

MIO, K.; STERN, R. Inhibitors of the hyaluronidases. **Matrix Biology**, Stuttgart, v. 21, n. 1, p. 31-37, Jan. 2002.

MOHAMED, A. H.; KAMEL, A.; AYOBE, M. H. Studies of phospholipase A and B activities of Egyptian snake venoms and a scorpion toxin. **Toxicon**, Oxford, v. 6, n. 4, p. 293-298, Mai. 1969.

MONTEIRO, H. S.; DA SILVA, I. M.; MARTINS, A. M.; FONTELES, M. C. Actions of *Crotalus durissus terrificus* venom and crotoxin on the isolated rat kidney. **Brazilian journal of medical and biological research**, Ribeirão Preto, v. 34, n. 10, p. 1347-1352, Out. 2001.

MORA-OBANDO, D.; FERNANDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Synergism between basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins of viperid snake venom *in vitro* and *in vivo*. **Plos One**, San Francisco, v. 9, n. 10, p. 11, Out. 2014.

MORAIS, V. M.; MASSALDI, H. Snake antivenoms: adverse reactions and production technology. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 15, n. 1, p. 2-18, 2009.

MORELLE, W.; MICHALSKI, J. C. Analysis of protein glycosylation by mass spectrometry. **Nature Protocols**, London, v. 2, n. 7, p. 1585-1602, Jun. 2007.

MORGENSTERN, D.; KING, G. F. The venom optimization hypothesis revisited. **Toxicon**, Oxford, v. 63, p. 120-128, Mar. 2013.

MORTON, C. L.; POTTER, P. M. Comparison of *Escherichia coli*, *Saccharomyces cerevisiae*, *Pichia pastoris*, *Spodoptera frugiperda*, and COS7 cells for recombinant gene expression. Application to a rabbit liver carboxylesterase. **Molecular Biotechnology**, Totowa, v. 16, n. 3, p. 193-202, Nov. 2000.

MUTZ, K. O.; HEILKENBRINKER, A.; LÖNNE, M.; WALTER, J. G.; FRANK, S. Transcriptome analysis using next-generation sequencing. **Current opinion in biotechnology**, London, v. 24, n. 1, p. 22-30, Fev. 2013.

NAIR, D. G.; FRY, B. G.; ALEWOOD, P.; KUMAR, P. P.; MANJUNATHA KINI, R. Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprin family of snake venom proteins. **The Biochemical Journal**, London, v. 402, n. 1, p. 93-104, Fev. 2007.

NAKAMURA, H.; MURAKAMI, T.; IMAMURA, T.; TORIBA, M.; CHIJIWA, T.; OHNO, M.; ODA-UEDA, N. Discovery of a novel vascular endothelial growth factor (VEGF) with no affinity to heparin in *Gloydius tsushimaensis* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 86, p. 107-115, Ago. 2014.

NEIVA, M.; VARGAS, D. C.; CONCEIÇÃO, K.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; ASSAKURA, M. T.; JARED, C.; HAYASHI, M. A. F. Gene expression analysis by ESTs sequencing of the Brazilian frog *Phyllomedusa nordestina* skin glands. **Toxicon**, Oxford, v. 61, p. 139-150, Jan. 2013.

NESVIZHSKII, A. I. Protein identification by tandem mass spectrometry and sequence database searching. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 367, p. 87-119, 2007.

NESVIZHSKII, A. I.; AEBERSOLD, R. Interpretation of shotgun proteomic data: the protein inference problem. **Molecular and Cellular Proteomics**, Bethesda, v. 4, n. 10, p. 1419-1440, Out. 2005.

NEVES-FERREIRA, A. G. C. Integrative structural biology in toxinology: Focus on natural inhibitors of snake venom toxins. *In: 20th World Congress of the International Society on Toxinology*, 2019, Buenos Aires. **Toxicon**, Oxford, v. 177, sup. 1, p. S7, Abr. 2020.

NEVES-FERREIRA, A. G. C.; VALENTE, R. H.; PERALES, J.; DOMONT, G. B. Natural inhibitors: innate immunity to snake venoms. *In: MACKESSY, S. P. (Ed.). Handbook of venoms and toxins of reptiles*. 1 ed. Boca Raton: CRC Press, 2010. cap. 12, p. 259-284.

NICOLAU, C. A.; CARVALHO, P. C.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; TEIXEIRA-FERREIRA, A.; JUNQUEIRA, M.; PERALES, J.; NEVES-FERREIRA, A. G. C.; VALENTE, R. H. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 151, p. 214-231, Jan. 2017.

NOBUHISA, I.; CHIWATA, T.; FUKUMAKI, Y.; HATTORI, S.; SHIMOHIGASHI, Y.; OHNO, M. Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes. **FEBS Letters**, Amsterdam, v. 429, n. 3, p. 385-389, Jun. 1998.

OGAWA, Y.; KANAI-AZUMA, M.; AKIMOTO, Y.; KAWAKAMI, H.; YANOSHITA, R. Exosome-like vesicles in *Gloydius blomhoffii blomhoffii* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 51, n. 6, p. 984-993, Mai. 2008.

OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Journal of Biochemistry**, Tokyo, v. 113, n. 4, p. 413-419, Abr. 1993.

OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. The two subunits of a phospholipase A<sub>2</sub> 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**, New York, v. 204, n. 3, p. 1212-1218, Nov. 1994.

OHKURA, N.; OKUHARA, H.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **The Biochemical Journal**, London, v. 325, p. 527-531, Jul. 1997.

OKUMURA, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Identification of beta-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor in a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 408, n. 1, p. 124-130, Dez. 2002.

OKUMURA, K.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. Identification and characterization of a serum protein homologous to alpha-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor (PLIalpha) from a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. **IUBMB Life**, London, v. 55, n. 9, p. 539-545, Set. 2003.

OKUMURA, K.; OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. A novel phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Sequence homologies with human leucine-rich  $\alpha_2$ -glycoprotein. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 273, n. 31, p. 19469-19475, Jul. 1998.

OLIVEIRA, C. Z.; MENALDO, D. L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M. An alpha-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: structural and functional characterization. **Biochimie**, Paris, v. 90, n. 10, p. 1506-1514, Out. 2008.

OLIVEIRA, I. S.; CARDOSO, I. A.; BORDON, K. C. F.; CARONE, S. E. I.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; PUCCA, M. B.; ZOCCAL, K. F.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V.; ROSA, J. C.; ARANTES, E. C. Global proteomic and functional analysis of *Crotalus durissus collilineatus* individual venom variation and its impact on envenoming. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 191, p. 153-165, Jan. 2019.

OLIVEIRA, S. S. D.; SAMPAIO, V. D. S.; SACHETT, J. D. A. G.; ALVES, E. C.; SILVA, V. C.; LIMA, J. A. A.; SILVA, I. M.; FERREIRA, L. C. L.; FAN, H. W.; LACERDA, M. V. G.; MONTEIRO, W. M. Snakebites in the Brazilian Amazon: Current Knowledge and Perspectives. *In*: GOPALAKRISHNAKONE, P.; FAIZ, S. M. A.; GNANATHASAN, C. A.;

HABIB, A. G.; FERNANDO, R.; YANG, C.; VOGEL, C.; TAMBOURGI, D. V.; SEIFERT, S. A. (Ed.). **Toxinology**. Dordrecht: Springer, 2017. v. 2, p. 22. (Clinical Toxicology).

OTROCK, Z. K.; MAKAREM, J. A.; SHAMSEDDINE, A. I. Vascular endothelial growth factor family of ligands and receptors: review. **Blood cells, molecules & diseases**, California, v. 38, n. 3, p. 258-268, Mai-Jun. 2007.

OVERTON, T. W. Recombinant protein production in bacterial hosts. **Drug discovery today**, Oxford, v. 19, n. 5, p. 590-601, Mai. 2014.

PAINE, M. J. I.; DESMOND, H. P.; THEAKSTON, R. D. G.; CRAMPTON, J. M. Gene expression in *Echis carinatus* (carpet viper) venom glands following milking. **Toxicon**, Oxford, v. 30, n. 4, p. 379-386, Abr. 1992.

PATRO, R.; DUGGAL, G.; LOVE, M. I.; IRIZARRY, R. A.; KINGSFORD, C. Salmon provides fast and bias-aware quantification of transcript expression. **Nature Methods**, New York, v.14, n. 4, p. 417-419, Abr. 2017.

PERALES, J.; VILLELA, C.; DOMONT, G. B.; CHOUMET, V.; SALIOU, B.; MOUSSATCHÉ, H.; BON, C.; FAURE, G. Molecular-structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 227, n. 1-2, p. 19-26, Jan. 1995.

PEREIRA, M. F.; NOVELLO, J. C.; CINTRA, A. C.; GIGLIO, J. R.; LANDUCCI, E. T.; OLIVEIRA, B.; MARANGONI, S. The amino acid sequence of bothropstoxin-II, an Asp-49 myotoxin from *Bothrops jararacussu* (Jararacucu) venom with low phospholipase A<sub>2</sub> activity. **Journal of Protein Chemistry**, New York, v. 17, n. 4, p. 381-386, Mai. 1998.

PETRAS, D.; HEISS, P.; SÜSSMUTH, R. D.; CALVETE, J. J. Venom Proteomics of Indonesian King Cobra, *Ophiophagus hannah*: Integrating Top-Down and Bottom-Up Approaches. **Journal of Proteome Research**, Wasington, v. 14, n. 6, p. 2539-2556, Jun. 2015.

PETROVIC, N.; GROVE, C.; LANGTON, P. E.; MISSO, N. L. A.; THOMPSON, P. J. A simple assay for a human serum phospholipase A<sub>2</sub> that is associated with high-density lipoproteins. **Journal of Lipid Research**, Memphis, v. 42, n. 10, p. 1706-1713, Out. 2001.

PICELLI, C. G.; BORGES, R. J.; FERNANDES, C. A. H.; MATIOLI, F. M.; FERNANDES, C. F. C.; SOBRINHO, J. C.; HOLANDA, R. J.; OZAKI, L. S.; KAYANO, A. M.; CALDERON, L. A.; FONTES, M. R. M.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Molecular cloning and structural modelling of gamma-phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from *Bothrops atrox* and *Micrurus lemniscatus* snakes. **International journal of biological macromolecules**, Amsterdam, v. 103, p. 525-532, Out. 2017.

PLA, D.; PETRAS, D.; SAVIOLA, A. J.; MODAHL, C. M.; SANZ, L.; PÉREZ, A.; JUÁREZ, E.; FRIETZE, S.; DORRESTEIN, P. C.; MACKESSY, S. P.; CALVETE J. J. Transcriptomics-guided bottom-up and top-down venomomics of neonate and adult specimens of the arboreal rear-fanged Brown Treesnake, *Boiga irregularis*, from Guam. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 174, p. 71-84, Mar. 2018.

- PLA, D.; SANZ, L.; MOLINA-SÁNCHEZ, P.; ZORITA, V.; MADRIGAL, M.; FLORES-DÍAZ, M.; ALAPE-GIRÓN, A.; NÚÑEZ, V.; ANDRÉS, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; CALVETE, J. J. Snake venomomics of *Lachesis muta rhombeata* and genus-wide antivenomics assessment of the paraspecific immunoreactivity of two antivenoms evidence the high compositional and immunological conservation across *Lachesis*. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 89, p. 112-123, Ago. 2013.
- PORTES-JUNIOR, J. A.; YAMANOUYE, N.; CARNEIRO, S. M.; KNITTEL, P. S.; SANT'ANNA, S. S.; NOGUEIRA, F. C. S.; JUNQUEIRA, M.; MAGALHÃES, G. S.; DOMONT, G. B.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Unraveling the Processing and Activation of Snake Venom Metalloproteinases. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 13, n. 7, p. 3338-3348, Jul. 2014.
- PRESNYAK, V.; ALHUSAINI, N.; CHEN, Y. H.; MARTIN, S.; MORRIS, N.; KLINE, N.; OLSON, S.; WEINBERG, D.; BAKER, K. E.; GRAVELEY, B. R.; COLLER, J. Codon optimality is a major determinant of mRNA stability. **Cell**, Cambridge, v. 160, n. 6, p. 1111-1124, Mar. 2015.
- PUNG, Y. F.; KUMAR, S. V.; RAJAGOPALAN, N.; FRY, B. G.; KUMAR, P. P.; MANJUNATHA KINI, R. Ohanin, a novel protein from king cobra venom: its cDNA and genomic organization. **Gene**, Amsterdam, v. 371, n. 2, p. 246-256, Abr. 2006.
- PUNG, Y. F.; WONG, P. T.; KUMAR, P. P.; HODGSON, W. C.; MANJUNATHA KINI, R. Ohanin, a novel protein from king cobra venom, induces hypolocomotion and hyperalgesia in mice. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 280, n. 13, p. 13137-13147, Abr. 2005.
- PUNGERCAR, J.; KRIZAJ, I. Understanding the molecular mechanism underlying the presynaptic toxicity of secreted phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, Oxford, v. 50, n. 7, p. 871-892, Dez. 2007.
- QUAX, T. E.; CLAASSENS, N. J.; SÖLL, D.; VAN DER OOST, J. Codon Bias as a Means to Fine-Tune Gene Expression. **Molecular Cell**, Cambridge, v. 59, n. 2, p. 149-161, Jul. 2015.
- QUIRÓS, S.; ALAPE-GIRÓN, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new alpha-type phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae). **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**, Oxford, v. 146, n. 1, p. 60-68, Jan. 2007.
- RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D. F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 801-810, Jun. 2004.
- RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolution of proteins of the cystatin superfamily. **Journal of Molecular Evolution**, Berlin, v. 30, n. 1, p. 60-71, Jan. 1990.

---

RAWLINGS, N. D.; BARRETT, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, London, v. 290, Pt 1, p. 205-218, Fev. 1993.

REEKS, T. A.; FRY, B. G.; ALEWOOD, P. F. Privileged frameworks from snake venom. **Cellular and Molecular Life Sciences**, Basel, v. 72, n. 10, p. 1939-1958, Mai. 2015.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W.; DRENTH, J.; SIGLER, P. B. A comparison of the crystal structures of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 260, n. 21, p. 11627-11634, Set. 1985.

RICHARDS, R.; ST PIERRE, L.; TRABI, M.; JOHNSON, L. A.; JERSEY, J.; MASCI, M. P.; LAVIN, M. F. Cloning and characterisation of novel cystatins from elapid snake venom glands. **Biochimie**, Paris, v. 93, n. 4, p. 659-668, Abr. 2011.

ROBERT, X.; GOUET, P. Deciphering key features in protein structures with the new ENDscript server. **Nucleic Acids Research**, London, v. 42, n. Web Server issue, p. W320-324, Jul. 2014.

ROCHA, S. L.; LOMONTE, B.; NEVES-FERREIRA, A. G.; TRUGILHO, M. R.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; HO, P. L.; DOMONT, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; PERALES, J. Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, n. 24, p. 6052-6062, Dez. 2002.

RODRIGUES, C. F. B.; SERINO-SILVA, C.; MORAIS-ZANI, K.; KAVAZOI, V. K.; CARVALHO, M. P. N.; GREGO, K. F.; CHIARELLI, T.; TASHIMA, A. K.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. BoayPLI: Structural and functional characterization of the gamma phospholipase A<sub>2</sub> plasma inhibitor from the non-venomous Brazilian snake *Boa constrictor*. **PLoS One**, San Francisco, v. 15, n. 2, p. e0229657, 2020.

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

RODRIGUEZ, J. P.; DE MARZI, M.; MARUÑAK, S.; MALCHIODI, E. L.; LEIVA, L. C.; ACOSTA, O. Rabbit IgG antibodies against phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus* neutralize the lethal activity of the venom. **Medicina-Buenos Aires**, Buenos Aires, v. 66, n. 6, p. 512-516, 2006.

ROKYTA, D. R.; LEMMON, A. R.; MARGRES, M. J.; ARONOW, K. The venom-gland transcriptome of the eastern diamondback rattlesnake (*Crotalus adamanteus*). **BMC Genomics**, London, v. 13, n. 312, Jul. 2012.

ROKYTA, D. R.; WRAY, K. P.; LEMMON, A. R.; LEMMON, E. M.; CAUDLE, S. B. A high-throughput venom-gland transcriptome for the Eastern Diamondback Rattlesnake

(*Crotalus adamanteus*) and evidence for pervasive positive selection across toxin classes. **Toxicon**, Oxford, v. 57, n. 5, p. 657-671, Abr. 2011.

ROMANOS, M.; SCORER, C.; SREEKRISHNA, K.; CLARE, J. The generation of multicopy recombinant strains. **Methods in Molecular Biology**, Clifton, v. 103, p. 55-72, 1998.

ROSANO, G. L.; CECCARELLI, E. A. Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges. **Frontiers in Microbiology**, Lausanne, v. 5, p. 172, Abr. 2014.

RYAN, N. M.; KEARNEY, R. T.; BROWN, S. G. A.; ISBISTER, G. K. Incidence of serum sickness after the administration of Australian snake antivenom (ASP-22). **Clinical Toxicology**, New York, v. 54, n. 1, p. 27-33, Jan. 2016

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Crotamine, a small basic polypeptide myotoxin from rattlesnake venom with cell-penetrating properties. **Current Pharmaceutical Design**, Schipol, v. 17, n. 38, p. 4351-4361, Dez. 2011.

RÁDIS-BAPTISTA, G.; KUBO, T.; OGUIURA, N.; PRIETO DA SILVA, A. R.; HAYASHI, M. A. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T. Identification of crotasin, a crotamine-related gene of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, Oxford, v. 43, n. 7, p. 751-759, Jun. 2004.

RÜBSAMEN, K.; BREITHAUPT, H.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. Subfractionation and recombination of the crotoxin complex. **Naunyn-Schmiedebergs Archiv für Pharmakologie**, Berlin, v. 270, n. 3, p. 274-288, 1971.

SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. Prediction of continuous B-cell epitopes in an antigen using recurrent neural network. **Proteins**, New York, v. 65, n. 1, p. 40-48, Out. 2006.

SALAZAR-VALENZUELA, D.; MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, M. L.; LOAIZALANGE, A.; GIBBS, H. L.; LOMONTE, B. Proteomic and toxicological profiling of the venom of *Bothrocophias campbelli*, a pitviper species from Ecuador and Colombia. **Toxicon**, Oxford, v. 90, p. 15-25, Nov. 2014.

SALVADOR, G. H.; DOS SANTOS, J. I.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. Crystal structure of a phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* venom: Insights into a new putative “myotoxic cluster”. **Biochimie**, Paris, v. 133, p. 95-102, Fev. 2017.

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R. M.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J.; BRIGATTE, P.; GUTIERREZ, V. P.; CURY, Y. Crotoxin: novel activities for a classic  $\beta$ -neurotoxin. **Toxicon**, Oxford, v. 55, n. 6, p. 1045-1060, Jun. 2010.

SANCHEZ, E. F.; FELICORI, L. F.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C.; MAGALHAES, H. B. P.; HERMOGENES, A. L.; DINIZ, M. V.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. M.; MAGALHÃES, A.; RICHARDSON, M. Biochemical characterization and molecular cloning of a plasminogen activator proteinase (LV-PA) from bushmaster snake venom. **Biochimica et biophysica acta. General subjects**, Amsterdam, v. 1760, n. 12, p. 1762-1771, Dez. 2006.

SANGER, F.; NICKLEN, S.; COULSON, A. R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 74, n. 12, p. 5463-5467, Dez. 1977.

SANTORO, M. L.; SOUSA-E-SILVA, M. C. C.; GONCALVES, L. R. C.; ALMEIDA-SANTOS, S. M.; CARDOSO, D. F.; LAPORTA-FERREIRA, I. L.; SAIKI, M.; PERES, C. A.; SANO-MARTINS, I. S. Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*). **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Pharmacology, Toxicology and Endocrinology**, Oxford, v. 122, n. 1, p. 61-73, Jan. 1999.

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

SANTOS-FILHO, N. A.; SANTOS, C. T. Alpha-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from snake blood. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 19, Mar. 2017.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; BOLDRINI-FRANÇA, J. Myotoxin Inhibitors. *In*: GOPALAKRISHNAKONE, P.; CRUZ, L.; LUO, S. (Ed.). **Toxins and Drug Discovery**. Dordrecht: Springer, 2017. p. 321-349.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub> inductor phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, Oxford, v. 52, n. 8, p. 908-917, Dez. 2008.

SANTOS-FILHO, N. A.; SOUSA, T. S.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; SANTOS-SILVA, L. K.; MENALDO, D. L.; HENRIQUE-SILVA, F.; CINTRA, A. C. O.; LAURE, H. J.; MAMEDE, C. C. N.; OLIVEIRA, F.; RIUL, T. B.; DIAS-BARUFFI, M.; ROSA, J. C.; SAMPAIO, S. V. rBaltMIP, a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* (*Rhinocerocephis alternatus*) snake, as a potential candidate to complement the antivenom therapy. **Toxicon**, Oxford, v. 124, p. 53-62, Dez. 2016.

SARTIM, M. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom galactoside-binding lectins: a structural and functional overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 21, n. 35, Set. 2015.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta**, Amsterdam, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, Nov. 2006.

SCHUSTER, S. C. Next-generation sequencing transforms today's biology. **Nature Methods**, New York, v. 5, n. 1, p. 16-18, Jan. 2008.

SCHWARZHANS, J. P.; WIBBERG, D.; WINKLER, A.; LUTTERMANN, T.; KALINOWSKI, J.; FRIEHS, K. Integration event induced changes in recombinant protein productivity in *Pichia pastoris* discovered by whole genome sequencing and derived vector optimization. **Microbial Cell Factories**, London, v. 15, n. 84, Mai. 2016.

SERINO-SILVA, C.; MORAIS-ZANI, K.; HIKARI TOYAMA, M.; TOYAMA, D. O.; GAETA, H. H.; RODRIGUES, C. F. B.; AGUIAR, W. S.; TASHIMA, A. K.; GREGO, K. F.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Purification and characterization of the first  $\gamma$ -phospholipase inhibitor ( $\gamma$ PLI) from *Bothrops jararaca* snake serum. **PLoS ONE**, San Francisco, v. 13, n. 3, p. e0193105, Mar. 2018.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, Oxford, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, Jun. 2005.

SERRANO, S. M.; REICHL, A. P.; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SANTORO, M. L.; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C.; ASSAKURA, M. T. A novel phospholipase A<sub>2</sub>, BJ-PLA<sub>2</sub>, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, New York, v. 367, n. 1, p. 26-32, Jul. 1999.

SHARP, P. M.; LI, W. H. The codon Adaptation Index-- a measure of directional synonymous codon usage bias, and its potential applications. **Nucleic Acids Research**, London, v. 15, n. 3, p. 1281-1295, Fev. 1987.

SHIRAI, R.; GOTOU, R.; HIRANO, F.; IKEDA, K.; INOUE, S. Autologous extracellular cytochrome c is an endogenous ligand for leucine-rich alpha2-glycoprotein and beta-type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 285, n. 28, p. 21607-21614, Jul. 2010.

SHIRAI, R.; TORIBA, M.; HAYASHI, K.; IKEDA, K.; INOUE, S. Identification and characterization of phospholipase A<sub>2</sub> inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. **Toxicon**, Oxford, v. 53, n. 6, p. 685-692, Mai. 2009.

SHU, Y. Z. Recent natural products based drug development: a pharmaceutical industry perspective. **Journal of Natural Products**, Cincinnati, v. 61, n. 8, p. 1053-1071, Ago. 1998.

SIEVERS, F.; WILM, A.; DINEEN, D.; GIBSON, T. J.; KARPLUS, K.; LI, W.; LOPEZ, R.; MCWILLIAM, H.; REMMERT, M.; SÖDING, J.; THOMPSON, J. D.; HIGGINS, D. G. Fast, scalable generation of high-quality protein multiple sequence alignments using Clustal Omega. **Molecular Systems Biology**, London, 7, n. 539, Out. 2011.

SILVA, L. C.; PUCCA, M. B.; PESSENDA, G.; CAMPOS, L. B.; MARTINEZ, E. Z.; CERNI, F. A.; BARBOSA, J. E. Discovery of human scFvs that cross-neutralize the toxic effects of *B. jararacussu* and *C. d. terrificus* venoms. **Acta Tropica**, Basel, v. 177, p. 66-73, Jan. 2018.

SMITH-UNNA, R.; BOURSNELL, C.; PATRO, R.; HIBBERD, J. M.; KELLY, S. TransRate: reference-free quality assessment of *de novo* transcriptome assemblies. **Genome Research**, New York, v. 26, n. 8, p. 1134-1144, Ago. 2016.

SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; FRANÇA, S. C.; GIGLIO, J. R.; WARD, R. J.; ARANTES, E. C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. **Biochemical and biophysical research communications**, New York, 302, n. 2, p. 193-200, Mar. 2003.

SOTO, J. G.; POWELL, R. L.; REYES, S. R.; WOLANA, L.; SWANSON, L. J.; SANCHEZ, E. E.; PEREZ, J. C. Genetic variation of a disintegrin gene found in the American copperhead snake (*Agkistrodon contortrix*). **Gene**, Amsterdam, v. 373, p. 1-7, Mai. 2006.

SOUZA-IMBERG, A.; CARNEIRO, S. M.; GIANNOTTI, K. C.; SANT'ANNA, S. S.; YAMANOUYE, N. Origin and characterization of small membranous vesicles present in the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, Oxford, v. 136, p. 27-33, Set. 2017.

SUNAGAR, K.; MORGENSTERN, D.; REITZEL, A. M.; MORAN, Y. Ecological venomics: How genomics, transcriptomics and proteomics can shed new light on the ecology and evolution of venom. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 135, p. 62-72, Mar. 2016.

SUNGA, A. J.; TOLSTORUKOV, I.; CREGG, J. M. Post-transformational vector amplification in the yeast *Pichia pastoris*. **FEMS Yeast Research**, Amsterdam, v. 8, n. 6, p. 870-876, Set. 2008.

TAKAHASHI, H.; HATTORI, S.; IWAMATSU, A.; TAKIZAWA, H.; SHIBUYA, M. A novel snake venom vascular endothelial growth factor (VEGF) predominantly induces vascular permeability through preferential signaling via VEGF receptor-1. **The Journal of Biological Chemistry**, Baltimore, v. 279, n. 44, p. 46304-46314, Out. 2004.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VAN DEN BERG, C. W.; MORGAN, B. P.; DE ARAUJO, P. S.; ALVES, E. W.; DA SILVA, W. D. Sphingomyelinases in the venom of the spider *Loxosceles intermedia* are responsible for both dermonecrosis and complement-dependent hemolysis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, New York, v. 251, n. 1, p. 366-373, Out. 1998.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, Basel, v. 9, n. 9, p. 290, Set. 2017.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, Oxford, v. 54, n. 1, p. 67-76, Jul. 2009.

TEIXEIRA, C. E. F.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, Rio de Janeiro, v. 100, Suppl 1, p. 181-184, Mar. 2005.

THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A.; GRIFFITHS, E. Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. **Toxicon**, Oxford, v. 41, n. 5, p. 541-557, Abr. 2003.

THERMO SCIENTIFIC. **DNA ladders - Thermo Scientific**. 2018. Disponível em: <<https://www.thermofisher.com/br/en/home/brands/thermo-scientific/molecular-biology/thermo-scientific-nucleic-acid-electrophoresis-purification/dna-electrophoresis-thermo-scientific/dna-ladders-thermo-scientific.html>>. Acesso em: 18 jun 2018.

THWIN, M. M.; SATISH, R. L.; CHAN, S. T.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Functional site of endogenous phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from python serum. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 269, n. 2, p. 719-727, Jan. 2002.

TSUCHIDA-STRAETEN, N.; ENSSLEN, S.; SCHÄFER, C.; WÖLTJE, M.; DENECKE, B.; MOSER, M.; GRÄBER, S.; WAKABAYASHI, S.; KOIDE, T.; JAHNEN-DECHENT, W. Enhanced blood coagulation and fibrinolysis in mice lacking histidine-rich glycoprotein (HRG). **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, Oxford, v. 3, n. 5, p. 865-872, Mai. 2005.

UEBERHEIDE, B. M.; FENYÖ, D.; ALEWOOD, P. F.; CHAIT, B. T. Rapid sensitive analysis of cysteine rich peptide venom components. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 106, n. 17, p. 6910-6915, Abr. 2009.

UETZ, P. **The Reptile Database**. 2020. Disponível em: <http://www.reptile-database.org/>. Acesso em: 04 fev. 2016.

UNIPROT CONSORTIUM. UniProt: a hub for protein information. **Nucleic Acids Research**, London, v. 43, n. Database issue, p. D204-212, Jan. 2015.

VAIYAPURI, S.; WAGSTAFF, S. C.; WATSON, K. A.; HARRISON, R. A.; GIBBINS, J. M.; HUTCHINSON, E. G. Purification and functional characterisation of rhiminopeptidase A, a novel aminopeptidase from the venom of *Bitis gabonica rhinoceros*. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 4, n. 8, p. e796, 2010.

VALENTE, R. H.; DRAGULEV, B.; PERALES, J.; FOX, J. W.; DOMONT, G. B. BJ46a, a snake venom metalloproteinase inhibitor. Isolation, characterization, cloning and insights into its mechanism of action. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 268, n. 10, p. 3042-3052, Mai. 2001.

VALENTE, R. H.; LUNA, M. S.; DE OLIVEIRA, U. C.; NISHIYAMA-JUNIOR, M. Y.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; PORTES-JUNIOR, J. A.; CLISSA, P. B.; VIANA, L. G.; SANCHES, L. MOURA-DA-SILVA, A. M.; PERALES, J.; YAMANOUYE, N. *Bothrops jararaca* accessory venom gland is an ancillary source of toxins to the snake. **Journal of Proteomics**, Amsterdam, v. 177, p. 137-147, Abr. 2018.

VERHEIJ, H. M.; BOFFA, M. C.; ROTHEN, C.; BRYCKAERT, M. C.; VERGER, R.; DE HAAS, G. H. Correlation of enzymatic activity and anticoagulant properties of phospholipase A<sub>2</sub>. **European Journal of Biochemistry**, Berlin, v. 112, n. 1, p. 25-32, Nov. 1980.

VETTER, I.; DAVIS, J. L.; RASH, L. D.; ANANGI, R.; MOBILI, M.; ALEWOOD, P. F.; LEWIS, R. J.; KING, G. F. Venomics: a new paradigm for natural products-based drug discovery. **Amino Acids**, Wien, v. 40, n. 1, p. 15-28, Jan. 2011.

VIEIRA, L. F.; MAGRO, A. J.; FERNANDES, C. A.; DE SOUZA, B. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; BUTZKE, D. S.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; GIGLIO, J. R.; SOARES, A. M. Biochemical, functional, structural and phylogenetic studies on Intercro, a new isoform phospholipase A<sub>2</sub> from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Biochimie**, Paris, v. 95, n. 12, p. 2365-2375, Dez. 2013.

VONK, F. J.; CASEWELL, N. R.; HENKEL, C. V.; HEIMBERG, A. M.; JANSEN, H. J.; MCCLEARLY, R. J. R.; KERKKAMP, H. M. E.; VOS, R. A.; GUERREIRO, I.; CALVETE, J. J.; WÜSTER, W.; WOODS, A. E.; LOGAN, J. M.; HARRISON, R. A.; CASTOE, T. A.; JASON DE KONING, A. P.; POLLOCK, D. D.; YANDELL, M.; CALDERON, D.; RENJIFO, C.; CURRIER, R. B.; SALGADO, D.; PLA, D.; SANZ, L.; HYDER, A. S.; RIBEIRO, J. M. C.; ARNTZEN, J. W.; VAN DEN THILLART, G. E. E. J. M.; BOETZER, M.; PIROVANO, W.; DIRKS, R. P.; SPAINK, H. P.; DUBOULE, D.; MCGLINN, E.; MANJUNATHA KINI, R.; RICHARDSON, M. K. The king cobra genome reveals dynamic gene evolution and adaptation in the snake venom system. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 110, n. 51, p. 20651-20656, Dez. 2013.

WAGNER, G. P.; KIN, K.; LYNCH, V. J. Measurement of mRNA abundance using RNA-seq data: RPKM measure is inconsistent among samples. **Theory in biosciences (Internet)**, v. 131, n. 4, p. 281-285, Dez. 2012.

WAHBY, A. F.; MAHDY, E.-S. M. E.; EL-MEZAYEN, H. A.; SALAMA, W. H.; EBRAHIM, N. M.; ABDEL-ATY, A. M.; FAHMY, A. S. Role of hyaluronidase inhibitors in the neutralization of toxicity of Egyptian horned viper *Cerastes cerastes* venom. **Journal of Genetic Engineering and Biotechnology**, Cairo, v. 10, n. 2, p. 213-219, Dez. 2012.

WANG, Y.; ZHANG, J.; ZHANG, D.; XIAO, H.; XIONG, S.; HUANG, C. Exploration of the Inhibitory Potential of Varespladib for Snakebite Envenomation. **Molecules**, Basel, v. 23, n. 2, p. 391, Fev. 2018.

WARD, R. J.; CHIOATO, L.; DE OLIVEIRA, A. H.; RULLER, R.; SÁ, J. M. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub>: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical journal**, Londo, v. 362, Pt 1, p. 89-96, Fev. 2002.

WARRELL, D. A. Snake bite. **Lancet**, London, v. 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.

WEBER, K.; OSBORN, M. The reliability of molecular weight determinations by dodecyl sulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 244, n. 16, p. 4406-4412, Ago. 1969.

WIEZEL, G. A. **Caracterização bioquímica e avaliação *in vitro* da ativação de fibroblastos e do potencial leishmanicida de uma L-aminoácido oxidase (LAAO) da peçonha de *Crotalus durissus terrificus***. 2016. Dissertação (Mestrado em Ciências) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2016.

WIEZEL, G. A.; BORDON, K. C. F.; SILVA, R. R.; GOMES, M. S. R.; CABRAL, H.; RODRIGUES, V. M.; UEBERHEIDE, B.; ARANTES, E. C. Subproteome of *Lachesis muta rhombeata* venom and preliminary studies on LmrSP-4, a novel snake venom serine proteinase.

---

**Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, Botucatu, v. 25, e147018, Abr. 2019.

WIEZEL, G. A.; DOS SANTOS, P. K.; CORDEIRO, F. A.; BORDON, K. C. F.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; UEBERHEIDE, B.; ARANTES, E. C. Identification of hyaluronidase and phospholipase B in *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, Oxford, 107, Part B, p. 359-368, Dez. 2015.

WIEZEL, G. A.; RUSTIGUEL, J. K.; MORGENSTERN, D.; ZOCCAL, K. F.; FACCIOLI, L. H.; NONATO, M. C.; UEBERHEIDE, B.; ARANTES, E. C. Insights into the structure, function and stability of bordonein-L, the first L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom. **Biochimie**, Paris, v. 163, p. 33-49, Mai. 2019.

WILLIAMS, H. F.; LAYFIELD, H. J.; VALLANCE, T.; PATEL, K.; BICKNELL, A. B.; TRIM, S. A.; VAIYAPURI, S. The Urgent Need to Develop Novel Strategies for the Diagnosis and Treatment of Snakebites. **Toxins**, Basel, v. 11, n. 6, p. 363-391, Jun. 2019.

XIAO, H.; PAN, H.; LIAO, K.; YANG, M.; HUANG, C. Snake venom PLA<sub>2</sub>, a promising target for broad-spectrum antivenom drug development. **BioMed research international (Online)**, p. 6592820, Nov. 2017.

YAMAZAKI, Y.; HYODO, F.; MORITA, T. Wide distribution of cysteine-rich secretory proteins in snake venoms: isolation and cloning of novel snake venom cysteine-rich secretory proteins. **Archives of biochemistry and biophysics**, New York, v. 412, n. 1, p. 133-141, Abr. 2003.

YAMAZAKI, Y.; MATSUNAGA, Y.; TOKUNAGA, Y.; OBAYASHI, S.; SAITO, M.; MORITA, T. Snake venom Vascular Endothelial Growth Factors (VEGF-Fs) exclusively vary their structures and functions among species. **Journal of biological chemistry**, Baltimore, v. 284, n. 15, p. 9885-9891, Abr. 2009.

YU, Y.; ZHOU, X.; WU, S.; WEI, T.; YU, L. High-yield production of the human lysozyme by *Pichia pastoris* SMD1168 using response surface methodology and high-cell-density fermentation. **Electronic Journal of Biotechnology**, Valparaiso, v. 7, n. 6, p. 311-316, Nov. 2014.

ZELANIS, A.; TASHIMA, A. K.; ROCHA, M. M. T.; FURTADO, M. F.; CAMARGO, A. C. M.; HO, P. L.; SERRANO, S. M. T. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome/Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 9, n. 5, p. 2278-2291, Mai. 2010.

ZHANG, C.; MEDZIHRADESKY, K. F.; SÁNCHEZ, E. E.; BASBAUM, A. I.; JULIUS, D. Lys49 myotoxin from the Brazilian lancehead pit viper elicits pain through regulated ATP release. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 114, n. 12, p. E2524-E2532, Mar. 2017.

ZHANG, J.; XIN, L.; SHAN, B.; CHEN, W.; XIE, M.; YUEN, D.; ZHANG, W.; ZHANG, Z.; LAJOIE, G. A.; MA, B. PEAKS DB: *de novo* sequencing assisted database search for sensitive

and accurate peptide identification. **Molecular & cellular proteomics**, Bethesda, v. 11, n. 4, p. M111.010587, Abr. 2012.

ZHOU, M.; WANG, T.; FU, J.; XIAO, G.; LIU, Y. Nonoptimal codon usage influences protein structure in intrinsically disordered regions. **Molecular microbiology**, Oxford, v. 97, n. 5, p. 974-987, Set. 2015.

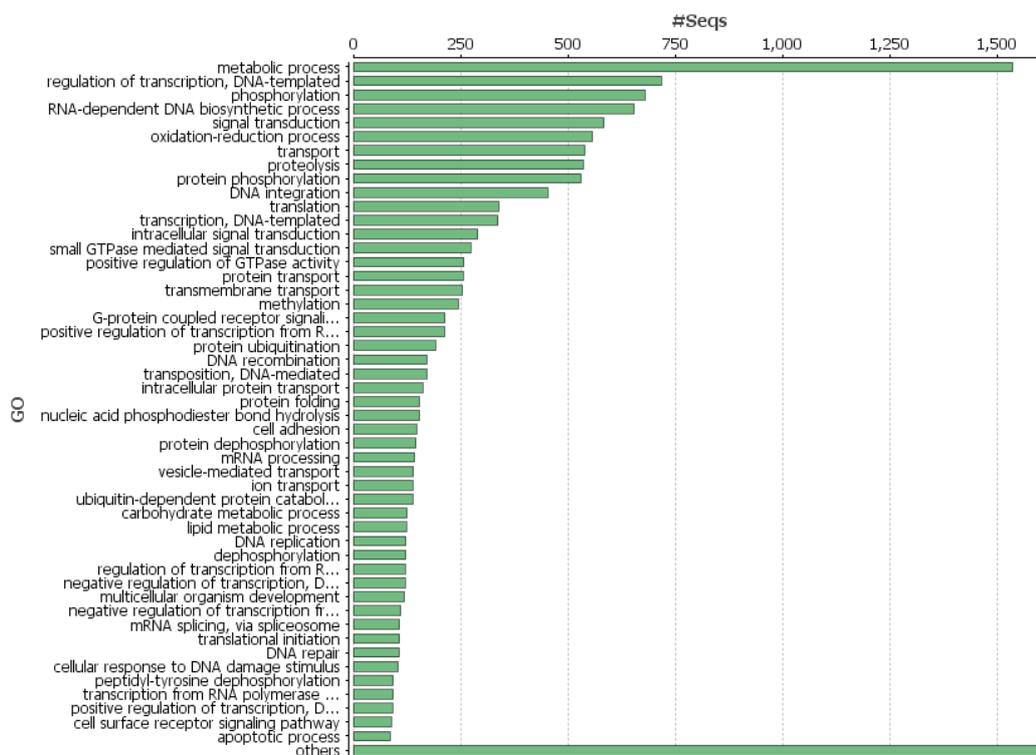
ZORNETTA, I.; CACCIN, P.; FERNANDEZ, J.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MONTECUCCO, C. Envenomations by *Bothrops* and *Crotalus* snakes induce the release of mitochondrial alarmins. **PloS Neglected Tropical Diseases**, San Francisco, v. 6, n. 2, p. e1526, Fev. 2012.

ZYBAILOV, B.; MOSLEY, A. L.; SARDIU, M. E.; COLEMAN, M. K.; FLORENS, L.; WASHBURN, M. P. Statistical analysis of membrane proteome expression changes in *Saccharomyces cerevisiae*. **Journal of Proteome Research**, Washington, v. 5, n. 9, p. 2339-2347, Set. 2006.

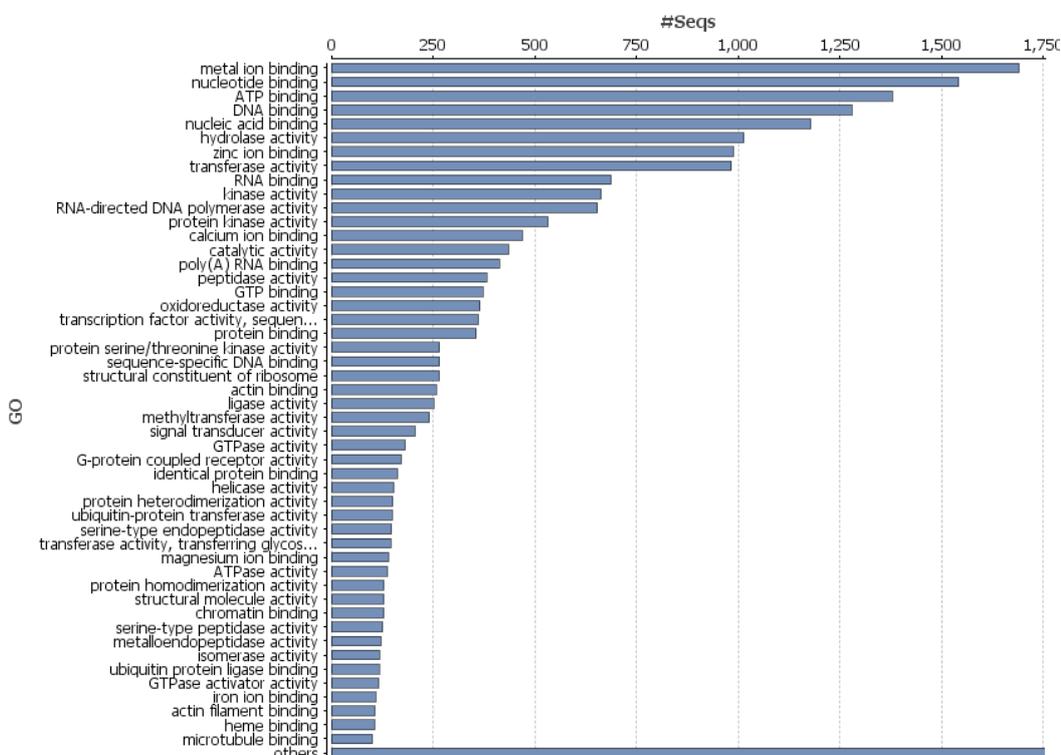


APÊNDICE – Distribuição dos transcritos da glândula de peçonha de *C. d. terrificus* seguindo a classificação de ontologia gênica (GO)

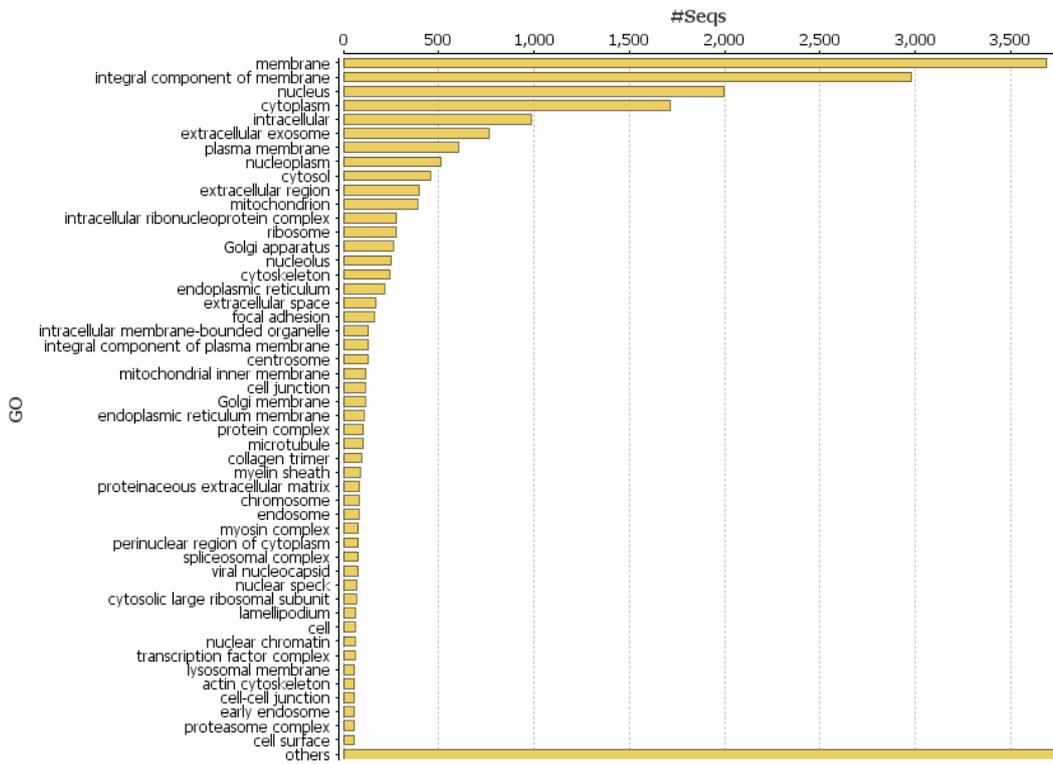
Processo Biológico



Função Molecular



**Componente Celular**





ANEXO A – Aprovação da etapa de experimentação animal para construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha de *C. d. terrificus*.



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO  
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto  
COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS



## CERTIFICADO

Certificamos que o projeto intitulado “Construção da biblioteca de cDNA da glândula de peçonha da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus*”, protocolo nº 15.5.256.60.2, sob a responsabilidade de Gisele Adriano Weizel e da Profa. Dra. Eliane Candiane Arantes, que envolve manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovado *ad referendum* pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na data de 12/04/2016.

Vigência do Projeto	Março/2016 a março/2018
Espécie/Linhagem	Réptil
Nº de animais	1
Peso/Idade	300g
Sexo	Indiferente
Origem	Biotério da FMRP

Ribeirão Preto, 12 de abril de 2016.

  
**Profa. Dra. Ana Patricia Yajsuqa Natsui**  
Presidente da CEUA-FCFRP

Avenida do Café S/Nº - Monte Alegre - CEP 14040-903 - Ribeirão Preto - SP  
Comissão de Ética no Uso de Animais - ceua@fcfrp.usp.br  
Fone: (16) 3315-8559 - Fax: (16) 33152-4892

## ANEXO B – Aprovação do ensaio de atividade antiedematogênica do rCdtPLI2.



**UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**  
**Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto**  
 COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS

## AUTORIZAÇÃO

Certificamos que a proposta intitulada "Caracterização de um inibidor de fosfolipase A2 da glândula de peçonha de *Crotalus durissus terrificus*: um possível adjuvante na terapia do envenenamento", registrada sob nº 17.1.126.60.6, sob a responsabilidade de Gisele Adriano Wiezel e Eliane Candiani Arantes Braga, que envolve a manutenção e utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem) para fins de pesquisa científica encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), foi aprovada pela Comissão de Ética no Uso de Animais da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (CEUA FCFRP) na reunião do dia 25/05/2017.

Lembramos da obrigatoriedade de apresentação do relatório de atividades, em modelo da CEUA, para emissão do certificado, como disposto nas Resoluções Normativas do CONCEA.

Finalidade	( ) Ensino (x) Pesquisa Científica
Vigência da Autorização	02/06/2017 a 31/01/2021
Espécie/Linhagem/Raça	Camundongo heterogênico Swiss
Nº de animais	90
Peso/Idade	18-22g
Sexo	Macho
Origem	Biotério central da PUSP-RP

Ribeirão Preto, 31 de maio de 2017.

Ana Patrícia Yatsuda Natsui  
 Coordenadora da CEUA-FCFRP

