

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ISADORA SOUSA DE OLIVEIRA

**Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da
peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

Ribeirão Preto

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ISADORA SOUSA DE OLIVEIRA

**Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da
peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

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 Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Co-orientadora: Profa. Dra. Manuela Berto Pucca

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 18/06/2021. 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 DESTES TRABALHOS, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Isadora Sousa de Oliveira

Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da
peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, 2021.

106 p.: il., fig., graf., tab.; 30 cm.

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

Orientadora: Arantes, Eliane Candiani

Co-orientadora: Pucca, Manuela Berto

1. *Crotalus durissus collilineatus*. 2. Peçonha de serpentes. 3. Nuclease. 4.
Fosfodiesterase. 5. Agregação plaquetária. 6. Citotoxicidade.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Isadora Sousa de Oliveira

Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*

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 Doutor em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Aprovado em: _____ de _____ de 2021.

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Este trabalho é dedicado para meus maiores
exemplos de amor e incentivo,
Ademir e Célia,
meus amados pais.

AGRADECIMENTOS

Agradeço, primeiramente, a Deus por estar sempre comigo, me conceder grandes oportunidades e colocar pessoas em meu caminho que me ajudaram de alguma forma.

Aos meus queridos pais, Ademir e Célia, pelo amor imenso e incondicional, educação, compreensão e paciência que formaram meu caráter, me ensinaram a nunca desistir de nada, principalmente da vida, e a sempre manter um sorriso no rosto. E à minha irmã, Evelise, pelo companheirismo e por ser um exemplo de profissional que trabalha com amor. Vocês são o alicerce da minha vida! Amo vocês!

Ao meu querido Rafael. Meu futuro marido, meu amigo, meu amor. Dono de uma enorme paciência. Obrigada por sempre compreender a minha ausência e estar comigo de alguma forma. Te amo!

Aos meus amados familiares que tanto contribuíram direta ou indiretamente para minha formação.

À minha orientadora, Profa. Eliane, por ter me dado a oportunidade de sua orientação. Durante todos estes anos que estive no Laboratório de Toxinas Animais, a senhora me ensinou todos os dias que não devemos perder o otimismo e a fé de que tudo um dia irá melhorar e dar certo. Sou grata por todas as oportunidades que a senhora me ofereceu e por toda bondade e paciência que tem. Não só uma orientadora, a senhora também é uma grande mãe. Uma mãe para todos seus alunos. Muito obrigada!

À minha co-orientadora, Profa. Manuela, mas também, uma querida amiga. Que está sempre me apoiando, ajudando, aconselhando e proporcionando grandes oportunidades. Me abrindo diversas portas, mas em especial, a porta da sua casa 9A (Dinamarca), para que eu não estivesse sozinha. Você me aconselhou desde o primeiro dia que a encontrei no laboratório que sempre podemos ter tempo para tudo na vida! Obrigada, miga!

Ao Prof. Loïc Quinton pela colaboração e também por ter me recebido em seu laboratório durante meu primeiro estágio no exterior. À equipe do Mass Spectrometry Laboratory, Dominique, Lisette, Nanou, Nancy e demais membros. E também às amigas que fiz neste laboratório, Sophie, Andreas e Eliane.

Ao Prof. Andreas Laustsen pela colaboração e também por ter me recebido tão bem em seu laboratório durante meu segundo estágio no exterior.

À Dra. Shirin Ahmadi, Konstantinos Kalogeropoulos, aos professores Maria Cristina Nonato, Marco Aurélio Sartim e Ulrich auf dem Keller pela colaboração e disposição para ajudar.

À Dra. Karla de Castro Figueiredo Bordon e Ma. Iara Aimê Cardoso, colaboradoras deste trabalho, que sempre ajudam a todos do laboratório quando precisam. Vocês foram essenciais para a realização deste trabalho!

À Profa. Suely Vilela pela colaboração e concessão das peçonhas utilizadas neste trabalho e à toda a equipe do Laboratório de Toxinologia.

Aos queridos amigos do Laboratório de Toxinas Animais: Isabela, uma amiga muito querida e companheira não só de laboratório e apelido, mas de muitas outras situações. Compartilhamos muitos momentos profissionais e pessoais, tanto bons quanto ruins. Você é muito especial! Felipe, amigo e sempre disposto a ajudar. Um grande companheiro de laboratório no Brasil e no exterior, bem como, companheiro de bike e compras! Gisele, amiga e também colaboradora deste trabalho, obrigada por compartilhar seu conhecimento comigo e com todos que a procuram! Ernesto, não só companheiro no laboratório, mas também no mundo afora! Francielle, uma querida e um exemplo de paciência com diversas situações! Beatriz, querida e sempre com longas conversas agradáveis!

Às queridas amigas, Rafaela, Elis, Patrícia, Luiza e Andréia, que estão sempre comigo, me incentivam e torcem por mim, e independente da situação, distância e tempo, nossa amizade é sempre igual. Obrigada por serem quem são. Amo todas vocês!

Às agências de fomento, Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP), pelas bolsas concedidas a mim, processos no. 2017/03580-9 (Bolsa no Brasil) e 2018/21233-7 (Bolsa BEPE), e ao projeto Temático (processo no. 2011/23236-4), e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior - Brasil (CAPES) - Código de Financiamento 001.

Por fim, agradeço a todos que contribuíram de alguma forma para a realização deste trabalho.

“Um cientista em seu laboratório não é um mero técnico: ele também é uma criança que enfrenta fenômenos naturais que o impressionam como se fossem contos de fadas.”

Marie Curie

RESUMO

OLIVEIRA, I. S. **Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***. 2021. 106f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Peçonhas ofídicas apresentam alta complexidade de componentes e, para a elucidação de seus mecanismos de toxicidade, é necessário que os mesmos sejam isolados e caracterizados, para que sua ação durante o envenenamento se torne esclarecida, facilitando o tratamento do respectivo sintoma. Muitos componentes minoritários da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* ainda não foram estudados. A fosfodiesterase (PDE) já havia sido identificada na peçonha, mas não tinha sido isolada ou caracterizada. Enzimas da classe PDE são responsáveis pela quebra das ligações fosfodiéster de ácidos nucléicos, ATP, ADP, NAD, NGD, AMPc e GMPc, interferindo em processos fisiológicos ou patológicos, o que as tornam alvos terapêuticos de diversas patologias. Assim, os objetivos deste estudo foram o isolamento e a caracterização bioquímica, estrutural e funcional da PDE da peçonha de *C. d. collilineatus* (*CdcPDE*). O isolamento da *CdcPDE* foi realizado por combinação de técnicas de cromatografia líquida, como filtração molecular, trocas aniônica e catiônica, respectivamente, sendo seu rendimento <1%. Por SDS-PAGE, foi possível observar sua migração como um monômero e a presença de glicosilações na molécula. Por espectrometria de massas, a *CdcPDE* apresentou duas massas moleculares determinadas por MALDI-TOF, 100 e 105 kDa, e por LC-MS/MS em união com o sequenciamento amino-terminal, foi possível determinar uma sequência para a *CdcPDE*, formada por 829 resíduos de aminoácidos. Por análises *in silico*, foi possível estimar as suas estruturas secundária e terciária, bem como a sua interação com o substrato *bis*(*p*-nitrofenil) fosfato. Utilizando este mesmo substrato, a *CdcPDE* apresentou maior atividade enzimática entre os pH 8 e 8,5, a 37 °C, e a melhor temperatura para armazená-la foi 0 °C. Alguns agentes redutores e um quelante metálico inibiram a atividade enzimática de *CdcPDE*, sugerindo que as pontes dissulfeto em sua estrutura são essenciais para a atividade, bem como os íons metálicos, o que a caracteriza como uma metaloenzima. Os parâmetros cinéticos obtidos foram: $K_m = 0,38$ mM, $V_{máx} = 0,7$ μ M/s, $k_{cat} = 0,14$ s⁻¹ e sua eficiência catalítica foi igual a 0,37 mM.s⁻¹, mostrando alta afinidade pelo substrato utilizado, bem como, eficiência cinética, quando comparada a outras PDE oriundas de peçonhas ofídicas. Outros ensaios demonstraram que a *CdcPDE* reduz/perde atividade enzimática com a perda de água e em contato com TFA, e sua temperatura de desenovelamento foi de 65,71 °C. Por ELISA, foi possível observar que o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan reconhece a *CdcPDE* e, por análise *in silico*, foram identificados 16 possíveis epítomos imunogênicos na molécula. Por fim, foi possível observar que a *CdcPDE* inibe a agregação de plaquetas induzidas por ADP e é uma molécula citotóxica para queratinócitos humanos, apresentando valor de IC₅₀ de 71,65 μ g/mL. Esta ação nunca foi relatada para PDE de peçonhas ofídicas, sugerindo também, a possibilidade de efeitos locais destas moléculas durante o envenenamento. Assim, estas enzimas podem ser importantes ferramentas moleculares para a pesquisa, bem como, para a terapêutica, visto que apresentam funções bioquímicas capazes de interferir tanto com processos fisiológicos quanto patológicos.

Palavras-chave: *Crotalus durissus collilineatus*, peçonha de serpente, nuclease, fosfodiesterase, agregação plaquetária, citotoxicidade.

ABSTRACT

OLIVEIRA, I. S. **Biochemical, structural and functional evaluation of a phosphodiesterase from *Crotalus durissus collilineatus* venom.** 2021. 106p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Snake venoms present a high complexity of components and, in order to elucidate their toxicity mechanisms, it is necessary that they are isolated and characterized, so that their action during envenoming becomes clarified, facilitating the respective symptom treatment. Many minority components from *Crotalus durissus collilineatus* venom have not yet been studied. Phosphodiesterase (PDE) had already been identified in the venom, but had not been isolated or characterized. PDE enzymes class are responsible for breaking phosphodiester bonds of nucleic acids, ATP, ADP, NAD, NGD, cAMP and cGMP, interfering in physiological or pathological processes, which make them therapeutic targets for various pathologies. Thus, the objectives of this study were the isolation and biochemical, structural and functional characterization of the PDE from *C. d. collilineatus* venom (*CdcPDE*). The *CdcPDE* isolation was performed by combining liquid chromatography techniques, such as molecular filtration, anion and cation exchanges, respectively, with a yield <1%. Through SDS-PAGE, it was possible to observe its migration as a monomer and the presence of glycosylations in the molecule. By mass spectrometry, *CdcPDE* showed two molecular masses determined by MALDI-TOF, 100 and 105 kDa, and by LC-MS/MS in union with the amino-terminal sequencing, it was possible to determine *CdcPDE* sequence, consisting by 829 amino acid residues. By *in silico* analysis, it was possible to estimate their secondary and tertiary structures, as well as their interaction with the *bis(p-nitrophenyl)* phosphate substrate. Using this same substrate, *CdcPDE* showed greater enzymatic activity between pH 8 and 8.5, at 37 °C, and the best temperature to store was 0 °C. Some reducing agents and a metal chelator inhibited the *CdcPDE* enzymatic activity, suggesting that the disulfide bridges in its structure are essential for the activity, as well as metal ions, which characterizes it as a metalloenzyme. Obtained kinetic parameters are: $K_m = 0.38$ mM, $V_{max} = 0.7$ μ M/s, $k_{cat} = 0.14$ s⁻¹ and its catalytic efficiency was equal to 0.37 mM.s⁻¹, showing high affinity by the substrate used, as well as, kinetic efficiency, when compared to others snake venom PDE. Other assays demonstrated that *CdcPDE* reduces/loses enzymatic activity with water loss and in contact with TFA, and its unfolding temperature was 65.71 °C. By ELISA, it was possible to observe that the anticrotalid serum produced by Instituto Butantan recognizes *CdcPDE* and, by *in silico* analysis, 16 possible immunogenic epitopes on the molecule were identified. Finally, it was possible to observe that *CdcPDE* inhibits platelet aggregation ADP-induced and it is a cytotoxic molecule for human keratinocytes, presenting an IC₅₀ value of 71.65 μ g/mL, and this action has never been reported for snake venoms PDE, also suggesting the possibility of local effects of these molecules during the envenoming. Thus, these enzymes can be important molecular tools for research, as well as, for therapy, since they have biochemical functions capable of interfering with both physiological and pathological processes.

Keywords: *Crotalus durissus collilineatus*, snake venom, nuclease, phosphodiesterase, platelet aggregation, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Serpente da família Viperidae	3
Figura 2. Exemplo do mecanismo de ação de PDE	9
Figura 3. Fluxograma representativo das metodologias utilizadas para a execução do estudo	16
Figura 4. Perfil cromatográfico da peçonha de <i>C. d. collilineatus</i> em coluna de filtração molecular e atividade enzimática	32
Figura 5. Perfil cromatográfico da fração S3 em coluna de troca aniônica e atividade enzimática	33
Figura 6. Perfil cromatográfico da fração A1 em coluna de troca catiônica e atividade enzimática	34
Figura 7. Perfil cromatográfico da fração C2 em coluna de fase reversa C4	35
Figura 8. Perfil eletroforético das frações obtidas nas etapas de purificação da <i>CdcPDE</i>	37
Figura 9. Massa molecular da <i>CdcPDE</i> determinada por MALDI-TOF	38
Figura 10. <i>Peptide mass fingerprint</i> (PMF) da <i>CdcPDE</i> digerida	39
Figura 11. Cobertura da sequência da <i>CdcPDE</i> proposta em nosso estudo pelo PMF	41
Figura 12. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	42
Figura 13. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	43
Figura 14. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	44
Figura 15. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	45
Figura 16. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	46
Figura 17. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	47
Figura 18. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	48
Figura 19. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	49
Figura 20. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	50
Figura 21. Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos encontrados	51
Figura 22. Alinhamento múltiplo entre sequências de <i>CdcPDE</i> e PDE de outras peçonhas ofídicas	52
Figura 23. Alinhamento entre as sequências de PDE de peçonhas de <i>C. d. collilineatus</i> e <i>C. d. terrificus</i>	54
Figura 24. Perfil eletroforético da <i>CdcPDE</i> para a identificação de N-glicosilações na molécula	56

Figura 25. Modelagem molecular da <i>CdcPDE</i>	57
Figura 26. Simulação da interação enzima-substrato: <i>CdcPDE-bis(p-nitrofenil) fosfato</i>	59
Figura 27. Influência de diferentes pH na atividade da <i>CdcPDE</i>	60
Figura 28. Influência de diferentes temperaturas na atividade da <i>CdcPDE</i>	61
Figura 29. Influência de diferentes temperaturas de armazenamento na atividade da <i>CdcPDE</i>	62
Figura 30. Curva cinética de formação do produto pela <i>CdcPDE</i>	63
Figura 31. Cinética enzimática de Michaelis-Menten da <i>CdcPDE</i>	64
Figura 32. Atividade da fosfodiesterase após processos de eliminação de água das amostras	65
Figura 33. Atividade da fosfodiesterase em diferentes concentrações de TFA	66
Figura 34. Estabilidade térmica da <i>CdcPDE</i>	68
Figura 35. Reconhecimento da <i>CdcPDE</i> pelo soro anticrotálico comercial através do método de ELISA	69
Figura 36. Predição de epítomos imunogênicos da <i>CdcPDE</i>	70
Figura 37. Inibição da agregação de plaquetas induzidas por ADP pela <i>CdcPDE</i>	71
Figura 38. Efeitos da <i>CdcPDE</i> na viabilidade de queratinócitos humanos (N/TERT) ..	72

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Epidemiologia dos acidentes ofídicos ocasionados por serpentes do gênero <i>Crotalus</i> no Brasil	5
Tabela 2. Lista de classes farmacológicas estabelecidas pelo FDA (EUA) em janeiro de 2021	11
Tabela 3. Recuperação proteica da <i>CdcPDE</i> durante as etapas de purificação	36
Tabela 4. Comparação entre os números de espectros e peptídeos obtidos a partir das diferentes digestões enzimáticas	40
Tabela 5. Porcentagem de atividade de <i>CdcPDE</i> na presença de diferentes concentrações de inibidores enzimáticos	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<i>A. bilineatus</i>	<i>Agistrodon bilineatus</i>
ACN	Acetonitrila
ADP	Difosfato de adenosina
AMPc	Monofosfato cíclico de adenosina
AMPD	2-amino-2-metil-1,3-propanodiol
ANOVA	Análise de variância
AST	Aspartato aminotransferase
ATP	Trifosfato de adenosina
<i>B. alternatus</i>	<i>Bothrops alternatus</i>
<i>B. atrox</i>	<i>Bothrops atrox</i>
<i>B. jararaca</i>	<i>Bothrops jararaca</i>
BLAST	<i>Basic Local Alignment Search Tool</i>
BSA	Soro albumina bovina
<i>C. adamanteus</i>	<i>Crotalus adamanteus</i>
<i>C. atrox</i>	<i>Crotalus atrox</i>
<i>C. cerastes</i>	<i>Cerastes cerastes</i>
<i>C. d. cascavella</i>	<i>Crotalus durissus cascavella</i>
<i>C. d. collilineatus</i>	<i>Crotalus durissus collilineatus</i>
<i>C. d. durissus</i>	<i>Crotalus durissus durissus</i>
<i>C. d. marajoensis</i>	<i>Crotalus durissus marajoensis</i>
<i>C. d. ruruima</i>	<i>Crotalus durissus ruruima</i>
<i>C. d. terrificus</i>	<i>Crotalus durissus terrificus</i>
<i>C. horridus</i>	<i>Crotalus horridus</i>
<i>C. m. pyrrhus</i>	<i>Crotalus mitchilli pyrrhus</i>
<i>C. r. ruber</i>	<i>Crotalus ruber ruber</i>
<i>C. v. helleri</i>	<i>Crotalus viridis helleri</i>
CdcPDE	Fosfodiesterase da peçonha de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CH ₃ COONa	Acetato de sódio
CK	Creatinoquinase
CMC-52	<i>Carboxymethyl cellulose-52</i>

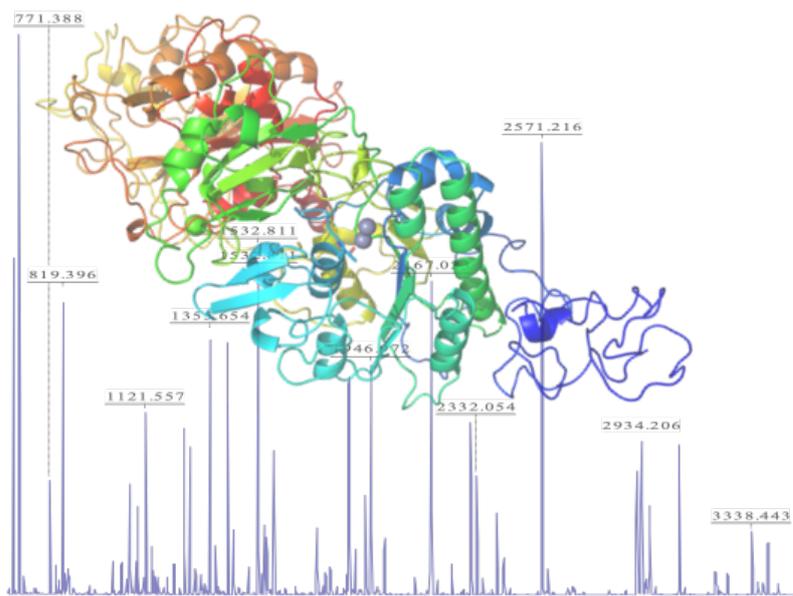
<i>D. russelli</i>	<i>Daboia russelli</i>
DATASUS	Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde
DMEM	<i>Dulbecco's modified Eagle's medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTN	Doenças Tropicais Negligenciadas
DTT	Ditiotreitol
EDTA	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
EPC	Classes Farmacológicas Estabelecidas
EUA	Estados Unidos da América
FCFRP	Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FMRP	Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto
FPLC	Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas
GMPC	Monofosfato cíclico de guanosina
GMQE	Estimativa de qualidade do modelo global
HEPES	N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico)
IAA	Iodoacetamida
IBAMA	Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis
IgG-HRP	Anticorpos policlonais anti-cavalo marcados com peroxidase
k_{cat}	Número de <i>turnover</i>
K_m	Constante de Michaelis
LC-MS/MS	Cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas
LDH	Lactato desidrogenase
LTA	Laboratório de Toxinas Animais
MALDI	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
MELD	Digestão multienzimática limitada
MES	Ácido 2-etanosulfônico
MPBS	Leite-Tampão fosfato salino
MS/MS	Espectrometria de massa em tandem
<i>N. nigricollis</i>	<i>Naja nigricollis</i>
NAD	Dinucleotídeo de nicotinamida e adenina

NCBI	<i>National Center for Biotechnology Information</i>
NGD	Dinucleotídeo de nicotinamida e guanina
OMS	Organização Mundial da Saúde
OPD–H ₂ O ₂	<i>o-phenylenediamine dihydrochloride-hydrogen peroxide</i>
PBS	Tampão fosfato salino
PBS-T	Tampão fosfato salino- <i>Tween</i>
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDE	Fosfodiesterase
pI	Ponto isoelétrico
PLA ₂	Fosfolipase A ₂
PMF	<i>Peptide Mass Fingerprint</i>
PRP	Plasma rico em plaquetas
PTC	Feniltiocarbamoil
QMEAN	Análise de energia do modelo qualitativo
RNA	Ácido ribonucléico
SDF	Dados da estrutura
SDS	Dodecil sulfafo de sódio
SDS-PAGE	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfafo de sódio
<i>T. stejnegeri</i>	<i>Trimeresurus stejnegeri</i>
<i>T. mucrosquamatus</i>	<i>Trimeresurus mucrosquamatus</i>
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TFA	Ácido trifluoroacético
T _m	Temperatura média de desenovelamento
TOF	<i>Time of flight</i>
UAE	Unidades de atividade enzimática
UniProtKB	<i>UniProt Knowledgebase</i>
UPLC	Cromatografia Líquida de Ultra Performance
USP	Universidade de São Paulo
<i>V. lebetina</i>	<i>Vipera lebetina</i>
<i>V. russelli</i>	<i>Vipera russelli</i>
V ₀	Velocidade inicial
V _{máx}	Velocidade máxima

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	ii
Lista de figuras	iii
Lista de tabelas	v
Lista de abreviaturas e siglas	vi
1. INTRODUÇÃO	1
1.1. Ofidismo e serpentes no Brasil	2
1.2. Envenenamentos por serpentes no Brasil e tratamento	4
1.3. Peçonhas crotálicas	6
1.4. Fosfodiesterases em peçonhas ofídicas	8
1.5 PDE em humanos e o uso de moléculas inibidoras como medicamentos	11
2. OBJETIVOS	13
3. MATERIAIS E MÉTODOS	15
3.1. Peçonhas ofídicas	16
3.2. Métodos cromatográficos para o isolamento da <i>CdcPDE</i>	17
3.2.1. Filtração molecular	17
3.2.2. Troca aniônica	17
3.2.3. Troca catiônica	17
3.3. Avaliação do grau de pureza	18
3.4. Quantificação de proteínas	18
3.5. Avaliação da atividade fosfodiesterásica	18
3.6. SDS-PAGE	19
3.7. Determinação de massa molecular por MALDI-TOF	19
3.8. Determinação da estrutura primária da <i>CdcPDE</i>	20
3.8.1. Sequenciamento N-terminal	20
3.8.2. Análises por espectrometria de massas	20
3.8.2.1. <i>Peptide Mass Fingerprint</i> (PMF) e sequenciamento <i>de novo</i>	20
3.8.2.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)	21
3.9. Alinhamento entre sequências	22
3.10. Identificação de glicosilação por SDS-PAGE	22
3.11. Modelagens estruturais	23
3.12. Avaliação da atividade fosfodiesterásica em diferentes pH	23
3.13. Avaliação da atividade fosfodiesterásica em diferentes temperaturas para o ensaio de atividade enzimática e armazenamento	24
3.14. Avaliação da atividade fosfodiesterásica com diferentes inibidores	24
3.15. Avaliação dos parâmetros cinéticos	25
3.16. Avaliação da atividade fosfodiesterásica após perda de água	25
3.17. Avaliação da atividade fosfodiesterásica com diferentes concentrações de TFA ..	26
3.18. Avaliação da estabilidade térmica em diferentes condições de pH e salinidade ...	26
3.19. Reconhecimento da <i>CdcPDE</i> pelo soro anticrotálico comercial	27
3.20. Predição de epítopos imunogênicos na <i>CdcPDE</i>	28
3.20. Ensaio de agregação plaquetária	28
3.21. Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos humanos (N/TERT)	29
4. RESULTADOS E DISCUSSÃO	30
4.1. Isolamento da PDE	31

4.2. Caracterização estrutural	36
4.3. Atividade enzimática de <i>CdcPDE</i>	60
4.4. Estabilidade da <i>CdcPDE</i>	65
4.5. Ensaio imunológicos	68
4.6. Ensaio de agregação plaquetária	70
4.7. Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos humanos	71
5. CONCLUSÕES	73
6. REFERÊNCIAS	75
ANEXOS	86
Anexo 1	87
Anexo 2	88



1. Introdução

1.1. Serpentes no mundo e no Brasil

Capazes de habitar todos os continentes do planeta, exceto a Antártida, as serpentes representam um grupo de vertebrados que obteve um grande sucesso evolutivo (MARQUES; MEDEIROS, 2018).

Existem mais de 11 mil espécies de répteis, incluindo 3.789 espécies de serpentes reconhecidas globalmente. Entre estas serpentes podemos citar as superfamílias Acrochordoidea, Booidea, Colubroidea, Elapoidea, Pythonoidea, Typhlopoidea, Uropeltoidea, e as famílias que não se enquadram a nenhuma destas superfamílias, Aniliidae, Bolyeriidae, Homalopsidae, Pareidae, Tropidophiidae, Viperidae, Xenodermidae e Xenophidiidae (UETZ, 2020).

Incluídas na família Viperidae podemos encontrar as víboras asiáticas e do velho mundo, além de cascavéis americanas (WARRELL, 2012). Serpentes pertencentes a esta família, possuem cabeça triangular, que é recoberta de escamas semelhantes às outras escamas de seu corpo (MELGAREJO, 2003). Esta família apresenta três subfamílias, Viperinae, Azemiopinae e Crotalinae, sendo esta última caracterizada por apresentar a chamada fosseta loreal, órgão capaz de detectar presas endotérmicas e suas direções, pois é um órgão termorreceptor, escamas dorsais carenadas e pupilas verticais (BULLOCK; COWLES, 1952; CAMPBELL; LAMAR, 2004; BAKKEN; KROCHMAL, 2007; UETZ, 2020).

Atualmente, o Brasil concentra 795 espécies de répteis, entre estas, 405 são espécies de serpentes, e apenas uma espécie de serpente do gênero *Crotalus* é distribuída por todo o território nacional, a espécie *Crotalus durissus*, popularmente conhecida como cascavel, pertencente a subfamília Crotalinae (COSTA; BÉRNILS, 2018; UETZ, 2020). Embora exista apenas uma espécie, existem seis subespécies de *C. durissus* em diferentes regiões do país (COSTA; BÉRNILS, 2018):

- *C. d. cascavella*: Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais;
- *C. d. collilineatus (Cdc)*: Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo;
- *C. d. durissus*: Amapá;
- *C. d. marajoensis*: Pará;
- *C. d. ruruima*: Roraima;



- *C. d. terrificus*: Tocantins, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

O gênero *Crotalus* tem seu nome derivado da palavra grega “*Krotalon*”, que significa “castanhola” ou “chocalho”, o que se refere ao final da cauda destas serpentes que apresentam um apêndice, que produz ruído semelhante a um chocalho quando o animal está irritado ou prestes a atacar presas (MELGAREJO, 2003; CAMPBELL; LAMAR, 2004). Este apêndice diferencia as cascavéis de outros gêneros de serpentes, como o gênero *Lachesis*, que possui as últimas escamas subcaudais eriçadas e modificadas, terminando num espinho, e o gênero *Bothrops*, que não possui modificações em sua cauda simples (MELGAREJO, 2003).

A figura 1 apresenta um exemplar da serpente *C. d. collilineatus*.



Figura 1. Serpente da família Viperidae. Foto de um exemplar da subespécie *Crotalus durissus collilineatus* (Arquivo do Laboratório de Toxinas Animais – LTA).

Sendo classificados como predadores ativos, as cascavéis se alimentam de pássaros, lagartos e pequenos mamíferos (LEMA; ARAÚJO; AZEVEDO, 1983; MACARTNEY, 1989). Para esta alimentação, bem como durante o envenenamento, a peçonha é injetada na presa através de compressão das glândulas de peçonha, localizadas na região pós-orbital da cabeça destes animais, associadas ao aparelho inoculador do tipo solenóglifo, constituído por um dente



funcional grande, agudo e oco (MELGAREJO, 2003; JACKSON, 2007; FRY et al., 2008; VONK et al., 2008).

1.2. Envenenamentos por serpentes no Brasil e tratamento

Mundialmente são registrados em média 5,4 milhões de acidentes ofídicos por ano, os quais levam em torno de 2,7 milhões de casos de envenenamentos, 138 mil mortes e 400 mil vítimas adquirem sequelas decorrentes desta patologia ou se tornam deficientes (WHO, 2019; BOLON et al., 2020).

Entre os locais mais afetados estão países tropicais e subtropicais, localizados na África, Ásia e América Latina, sendo que apenas nesta última ocorrem entre 137 mil e 150 mil casos, acarretando em até 5 mil mortes por ano (GUTIÉRREZ et al., 2017; WHO, 2019). Devido a sua grande ocorrência, a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) adicionou novamente os acidentes ofídicos à lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), com altíssima prioridade (categoria A) em 2019 (WHO, 2019).

Curiosamente, esta doença ocupacional apresenta semelhança epidemiológica com outras zoonoses, devido à transmissão de patógenos a humanos através de animais, mas, ao contrário destas, é difícil mapear, prever e reduzir riscos destes acidentes ofídicos, visto que ainda não é possível controlá-los, como ocorre com algumas zoonoses (MURRAY; MARTIN; IWAMURA, 2020).

Indivíduos que não têm acesso, ou pouco acesso, a sistemas de saúde e educação, são os mais acometidos pelos acidentes ofídicos. Estes fazem parte de camadas socioeconômicas mais inferiores, como pescadores, caçadores e agricultores, ou vivem em extrema pobreza, mas também estão incluídos indigentes e indígenas, os quais são frequentemente acidentados em florestas enquanto estão trabalhando ou, simplesmente, andando (PIERINI et al., 1996; HARRISON et al., 2009; HABIB et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2017).

No Brasil, esta questão também é preocupante, visto que ocorreram mais de 25 mil casos de acidentes ofídicos por ano, conforme dados dos últimos cinco anos (Tab. 1). Os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* são os mais numerosos, seguidos pelos acidentes ocasionados por serpentes do gênero *Crotalus*, que embora em menor número, aproximadamente 10 vezes menor, apresenta maior letalidade, visto que a peçonha destes animais é considerada mais tóxica, de acordo com dados do Ministério da Saúde (BRAZIL,



1911; BELLUOMINI, 1984; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001, 2021; FERREIRA-JÚNIOR, 2003).

Tabela 1. Epidemiologia dos acidentes ofídicos ocasionados por serpentes do gênero *Crotalus* no Brasil.

Ano	Acidentes ofídicos	Acidentes crotálicos	Tipo de acidente crotálico			Óbitos
			Leve	Moderado	Grave	
2015	27.113	1.972	825	786	258	256
2016	26.561	2.182	936	824	292	280
2017*	28.752	2.506	1.139	875	353	307
2018*	28.857	2.555	1.113	962	356	303
2019*	30.482	2.610	1.193	1.020	279	413

Dados coletados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

*Dados sujeitos a revisão.

Os acidentes crotálicos são caracterizados por sua ação neurotóxica, pois neurotoxinas presentes na peçonha são capazes de atingir o sistema nervoso central e periférico, causando paralisia, devido a inibição de neurotransmissor nas fendas sinápticas. Assim, entre os sinais do envenenamento crotálico estão parestesia de músculos faciais (face miastênica), ptose palpebral e paralisia gradual dos músculos respiratórios (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003; TOKARNIA et al., 2014).

Já as miotoxinas presentes nestas peçonhas causam lesões teciduais sistêmicas em músculos esqueléticos, desencadeando o processo de rabdomiólise, seguido por mioglobínúria, o que leva a coloração escurecida da urina da vítima do envenenamento crotálico. Por causa desta situação, lesões tubulares renais podem ocorrer, levando à insuficiência renal aguda (IRA); e o paciente pode apresentar oligúria ou anúria. A IRA e o choque cardiovascular são as principais causas de óbito de pacientes envenenados (WHO, 2007; TOKARNIA et al., 2014; MEDEIROS et al., 2020).

As vítimas de envenenamento crotálico apresentam dor difusa e em seus dados laboratoriais são observados aumentos significativos de aldolase, aspartato aminotransferase (AST), creatinoquinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003). Ainda, esta peçonha possui ação semelhante à trombina, consumindo fibrinogênio, ocasionando a hipofibrinogenemia e, assim, o sangue se torna incoagulável (THOMAZINI; BARRAVIERA; BARRAVIERA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; TOKARNIA et al., 2014).



Estes envenenamentos crotálicos podem ser considerados como leves, moderados e graves, de acordo com os sinais e sintomas apresentados pelas vítimas, variando entre ausentes e totalmente evidentes e intensos, e, a partir desta gravidade, a quantidade de ampolas de soro antiofídico a ser infundido no paciente é determinada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Este soro é constituído por imunoglobulinas obtidas a partir do sangue de animais hiperimunizados (cavalos) com peçonhas específicas (WHO, 2010). Este tratamento é essencial e tem sido utilizado há mais de um século, sendo introduzido em 1895, por Albert Calmette, na clínica dos envenenamentos. Posteriormente, a técnica de soroterapia heteróloga foi explorada e aprimorada no Brasil por Vital Brazil Mineiro da Campanha (LIRA-DA-SILVA et al., 2018). Além da terapia específica com o antiveneno, a terapia geral também necessita de outras técnicas de emergência, as quais são realizadas de acordo com outros fatores de risco, como problemas cardíacos e respiratórios (WARRELL, 2010).

1.3. Peçonhas crotálicas

Constituídas de diversos tipos de componentes, entre eles carboidratos, lipídeos e aminoácidos, as peçonhas crotálicas possuem majoritariamente proteínas (90% a 95%) (ARAÚJO et al., 2016), que podem ser divididas entre componentes não enzimáticos e enzimáticos (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007).

Nestas peçonhas destaca-se a ocorrência da proteína crotóxina, por ser o componente mais tóxico (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971) e mais abundante, correspondendo entre 65-68% da peçonha (DA SILVA; BIER, 1982). Na verdade, a crotóxina é um complexo de duas proteínas ou subunidades, a fosfolipase A₂ (PLA₂, subunidade básica) e a crotapotina (subunidade ácida), sendo esta última desprovida de atividade enzimática, porém capaz de inibir atividade enzimática da PLA₂, aumentando também a sua toxicidade (CHANG; SU, 1981; RADVANYI et al., 1989). Além da atividade miotóxica, esta PLA₂ possui ação neurotóxica por impedir que neurotransmissores sejam liberados na placa motora. Entretanto, a PLA₂ apenas realiza esta última ação quando está complexada com a crotapotina, a qual atua como uma chaperona, evitando ligações inespecíficas da PLA₂ e sua atividade na junção pré-sináptica (CHANG; SU, 1981; BON et al., 1989; CHOUMET et al., 1993; CLISSA, 1997).

Existem enzimas capazes de causar hemorragia, que são as metaloproteases (GUTIÉRREZ et al., 2016). As metaloproteases apresentam atividades fibrinolítica e fibrinogenolítica, ativam fator X e protrombina, podem inibir a agregação de plaquetas e ainda



induzem apoptose (FOX; SERRANO, 2005), tendo uma importante função na fisiopatologia dos envenenamentos (FOX; SERRANO, 2009).

Outra enzima presente na peçonha que atua no sistema hematológico é a serinoprotease, inferindo na coagulação sanguínea, agregação plaquetária e fibrinólise (SERRANO; MAROUN, 2005). Entre as serinoproteases estão as enzimas trombina-símile, que agem sobre proteínas plasmáticas, semelhante a ação da trombina, causando distúrbios hematológicos também (ALEXANDER et al., 1988; SERRANO; MAROUN, 2005). Neste grupo, também se destacam as gioxinas, capazes de causar lesões no labirinto de animais envenenados, induzindo-os a girar em torno de seus próprios eixos (BACILA, 1961; BARRABIN et al., 1978; SEKI; VIDAL; BARRIO, 1980).

Já entre componentes não-enzimáticos, pode ser encontrada a crotamina (GONÇALVES; VIEIRA, 1950), capaz de despolarizar células e agir de forma miotóxica (OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005). Esta miotoxina pode estar ou não presente na peçonha de cascavéis brasileiras, de forma que sua frequência aumenta de acordo com o eixo leste-oeste, bem como, norte-sul do Brasil, sendo que nos centros destes eixos, é possível encontrar ambas as peçonhas, crotamina-positiva e negativa (SCHENBERG, 1959; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Além disso, a crotamina pode atuar em canais iônicos para potássio, bloqueando-os, de forma que causa a extensão e paralisia de patas traseiras de camundongos (PEIGNEUR et al., 2012).

Além da crotamina, a convulxina também está presente em peçonhas crotálicas. Esta proteína é formada por duas subunidades, α e β , formando uma estrutura tetramérica (MARLAS, 1985), sendo um potente ativador da agregação plaquetária (VARGAFTIG et al., 1980; FRANCISCHETTI et al., 1997), porém desprovido de ação hemaglutinante (TOYAMA et al., 2001; ARLINGHAUS; EBLE, 2012).

Além destes componentes, também pode ser observada a ocorrência de outros componentes, mas em menores proporções, como hialuronidases (BORDON et al., 2012), L-aminoácido oxidases (DU; CLEMETSON, 2002), lectinas (OGAWA et al., 2005), desintegrinas (OLIVEIRA et al., 2018), peptídeos potencializadores de bradicinina (HIGUCHI et al., 2006), fatores de crescimento e nucleases (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2017), sendo todos estes e os já citados passíveis a variações qualitativas e quantitativas, alterando assim a toxicidade e as manifestações clínicas do envenenamento (ARAÚJO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2019).



1.4. Fosfodiesterases em peçonhas ofídicas

Dentre as nucleases, enzimas capazes de realizar hidrólise de ácidos nucleicos e seus derivados, existem as endonucleases (DELEZENNE; MOREL, 1919), denominadas DNAses (TABORDA et al., 1952a) e RNAses (TABORDA et al., 1952b), responsáveis pela hidrólise de ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), respectivamente, e exonucleases, representadas apenas pelas fosfodiesterases (PDE, do inglês *phosphodiesterases*) (UZAWA, 1932). As PDE são enzimas capazes de hidrolisar as ligações fosfodiéster de polinucleotídeos em pH básico, iniciando pela extremidade 3', liberando 5'-mononucleotídeos (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010).

Alguns parâmetros bioquímicos são levados em consideração para a diferenciação entre os dois grupos enzimáticos. Nucleases que apresentam pH ótimo mais ácido e não necessitam de cátions divalentes para sua atividade são consideradas endonucleases. Enquanto exonucleases são aquelas que apresentam pH ótimo básico e necessitam de íons metálicos divalentes para sua atividade (GEORGATSOS; LASKOWSKI, 1962; IWANAGA; SUZUKI, 1979; MACKESSY, 1998; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010).

Além da hidrólise de DNA e RNA, PDE hidrolisam também trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD), dinucleotídeo de nicotinamida e guanina (NGD), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), regulando estes segundos mensageiros (SEGOVIA; FIGUEROA, 2007; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010). Assim, estas enzimas são capazes de intervir em processos fisiológicos, como contração muscular, diferenciação celular, a função de canais iônicos, lipogênese, gliconeogênese, glicogenólise e apoptose (PERRY; HIGGS, 1998; JEON et al., 2005; PENG et al., 2011).

Esta família de enzimas pode ser dividida e classificada de 1 a 11, sendo PDE1 a PDE11, de acordo com a sensibilidade para inibidores, a sequência proteica, propriedades farmacológicas e a especificidade para o substrato, sendo que PDE 4, 7 e 8 são específicas para a degradação de AMPc, 5, 6 e 9 para GMPc e 1, 2, 3, 10 e 11 para a degradação de ambos os substratos (MEHATS et al., 2002; MASSIMI et al., 2017), como demonstrado na figura 2.



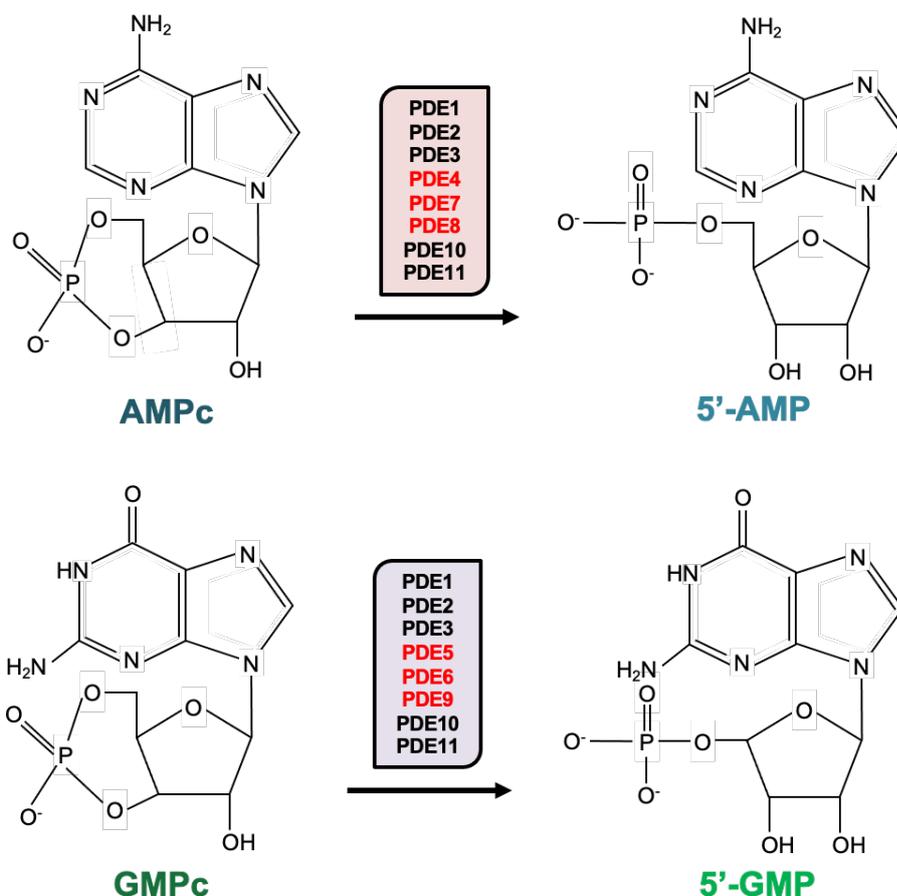


Figura 2. Exemplo do mecanismo de ação de PDE. As reações hidrólise das moléculas de AMPc e GMPc, catalisadas por PDE, originam as moléculas de 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente, devido a quebra da ligação fosfodiéster presente nas moléculas. Em vermelho estão destacadas as PDE específicas para a hidrólise de cada molécula em questão.

Através de análises ômicas, estas enzimas foram encontradas em diversas peçonhas ofídicas, como em *Pseudonaja textilis* (MCCLEARY et al., 2016), *Micrurus dumerilii* (REY-SUÁREZ et al., 2016), *Calloselasma rhodostoma* (TANG et al., 2016) e *Daboia russelli* (TAN et al., 2015a), bem como, dados de transcriptoma também revelam uma grande distribuição de PDE entre serpentes, por exemplo, em *Gloydus intermedius* (YANG et al., 2015) e *Ophiophagus hannah* (TAN et al., 2015b).

Entre essa vasta dispersão de gêneros de serpentes, observa-se que os que mais causam acidentes ofídicos no Brasil, *Bothrops* e *Crotalus*, também apresentam esta enzima na composição de suas peçonhas, como *Bothrops alternatus* (VALÉRIO et al., 2002), *B. atrox* (PHILIPPS, 1976), *B. jararaca* (SANTORO et al., 2009), *C. adamanteus* (PHILIPPS, 1975; STOYNOV et al., 1997), *C. d. terrificus* (PHILIPPS, 1975), *C. ruber ruber* (MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987) e *C. mitchilli pyrrhus* (PERRON; MACKESSY; HYSLOP, 1993).



Estas enzimas possuem alta massa molecular (~90-160 kDa), apresentando-se como uma única cadeia polipeptídica ou como um homo ou heterodímero (MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; PERRON; MACKESSY; HYSLOP, 1993; VALÉRIO et al., 2002; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010; AL-SALEH; KHAN, 2011; FOX, 2013; TRUMMAL et al., 2014). Seu ponto isoelétrico (pI) varia entre 7,4 e 10,5 (PHILIPPS, 1975; MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; VALÉRIO et al., 2002; AL-SALEH; KHAN, 2011) e também são metaloglicoproteínas (DOLAPCHIEV; VASSILEVA; KOUMANOV, 1980; KINI; GOWDA, 1984; AL-SALEH; KHAN, 2011).

Apesar de estarem amplamente dispersas entre peçonhas ofídicas, pouco são os estudos sobre suas atividades biológicas frente ao envenenamento (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010). Santoro e colaboradores (2009) observaram que PDE oriundas de *B. jararaca* inibiram a agregação de plaquetas, de forma que, quando induzidas por trombina, ocorria um ligeiro decréscimo na agregação, enquanto, induzidas por ADP, o processo de agregação não ocorria. Já Peng e colaboradores (2011) e Mitra e Bhattacharyya (2014) também verificaram este último efeito, pois as PDE de *Trimeresurus stejnegeri* e *D. russelli*, respectivamente, podem ter sido capazes de hidrolisar ADP, causando este efeito inibitório. Assim, por esta ação, PDE podem servir como ferramentas biológicas no tratamento e na prevenção de patologias que tenham por característica o aumento da agregação plaquetária (MITRA; BHATTACHARYYA, 2014), como Tirofiban (Aggrastat[®]) and Eptifibatide (Integrilin[®]), drogas aprovadas pelo pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA, EUA), capazes de inibir a agregação de plaquetas e são oriundas de peçonhas ofídicas (KING, 2011; BORDON et al., 2020).

Outro estudo realizado por Russell, Buess e Woo (1963) mostrou que, a partir da purificação parcial de PDE das peçonhas de *C. adamanteus*, *C. atrox*, *C. viridis helleri*, *C. horridus* e *Vipera russelli*, foi possível observar que estas enzimas levaram a uma crise hipotensora, com diminuição da pressão arterial e depressão locomotora de animais, podendo estes efeitos estarem relacionados com a depleção de AMPc. Este estudo tornou-se muito relevante para o conhecimento desta enzima, pois mostra que existem substratos para PDE na circulação de vítimas que podem levar a hipotensão, mesmo que não ocorram processos citolíticos concomitantes (AIRD, 2002; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010).

Desde a sua descoberta, as PDE apresentam interesse científico, pois auxiliam na caracterização de ácidos nucléicos e também podem servir como ferramentas de biologia molecular. Entre as nucleases, as PDE são as que mais apresentam estudos em relação a sua caracterização a partir de peçonhas ofídicas (FOX, 2013).



1.5. PDE em humanos e o uso de moléculas inibidoras como medicamentos

É amplamente conhecido que as PDE também são expressas por seres humanos em diversos tecidos e órgãos, como fígado, coração, pulmões, rins, bexiga, uretra, próstata, pênis, útero, músculos esqueléticos e liso vascular (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006). Ressalta-se que as PDE5s são expressas em várias regiões do cérebro, e sua alta expressão, atividade, e a diminuição de níveis de GMPc estão intimamente relacionados ao envelhecimento, de forma que, para prevenir este problema e aumentar níveis de GMPc, inibidores de PDE5 podem ser utilizados (EL-BAKLY et al., 2019).

Devido à necessidade terapêutica frente a patologias relacionadas às PDE, a pesquisa e o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir a ação destas enzimas compõem um novo grupo de alvos terapêuticos para algumas enfermidades, como doenças cardiovasculares, inflamatórias, disfunção erétil e a doença de Alzheimer (PÉREZ-TORRES et al., 2003; CASTRO et al., 2005; JEON et al., 2005; UCKERT et al., 2006; MILLER; YAN, 2010; PENG et al., 2011).

Em janeiro de 2021, foi disponibilizada uma lista de Classes Farmacológicas Estabelecidas (EPC, do inglês *Established Pharmacologic Class*) pelo FDA, a qual constam 9 moléculas inibidoras de algumas classes de PDE, como descrito na tabela 2. Entre estas moléculas listadas pela FDA, a que se destaca popularmente é a Sildenafil (Viagra®), muito utilizado para o tratamento de disfunção erétil, pois é uma molécula inibidora de PDE5 com alta seletividade (BALLARD et al., 1998).

Tabela 2. Lista de classes farmacológicas estabelecidas pelo FDA (EUA) em janeiro de 2021.

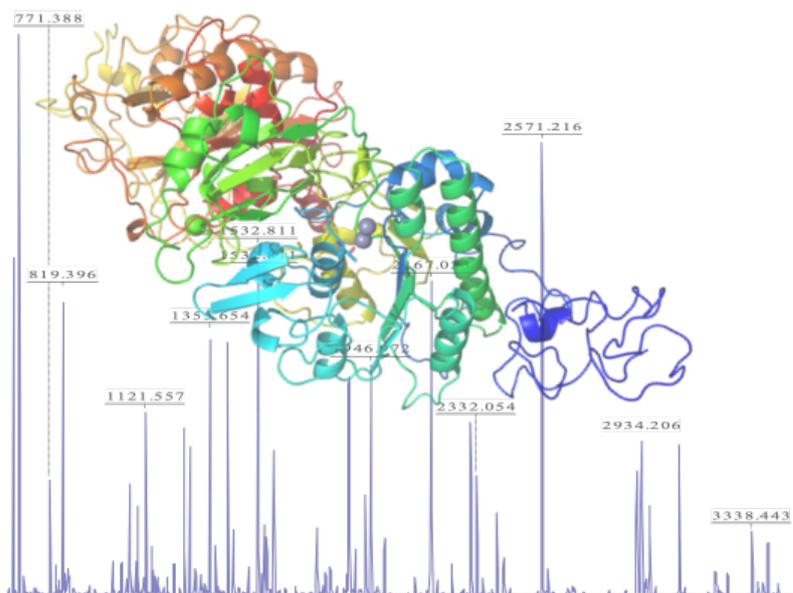
Composto ativo	Nome comercial	Classe de PDE inibida
Cilostazol	Cebralat® (Libbs Farmacêutica)	PDE3
Milrinona	Primacor® (Sanofi)	
Apremilaste	Otezla® (Celgene International Sarl)	PDE4
Crisaborole	Eucrisa® (Anacor Pharmaceuticals Inc.)	
Roflumilaste	Daxas® (AstraZeneca)	
Avanafil	Spedra® (Vivus)	PDE5
Sildenafil	Viagra® (Pfizer)	
Tadalafila	Cialis® (Eli Lilly do Brasil Ltda.)	
Vardenafil	Levitra® (Bayer)	

Dados oriundos do FDA (EUA).



Ainda existem poucos estudos sobre as ações farmacológicas destas enzimas (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010), entretanto o uso de moléculas capazes de inibi-las tem sido amplo. Assim, estudos mais aprofundados devem ser realizados para ampliar a compreensão desta classe enzimática e suas ações em processos fisiológicos e patológicos, bem como durante os casos de envenenamentos ofídicos.





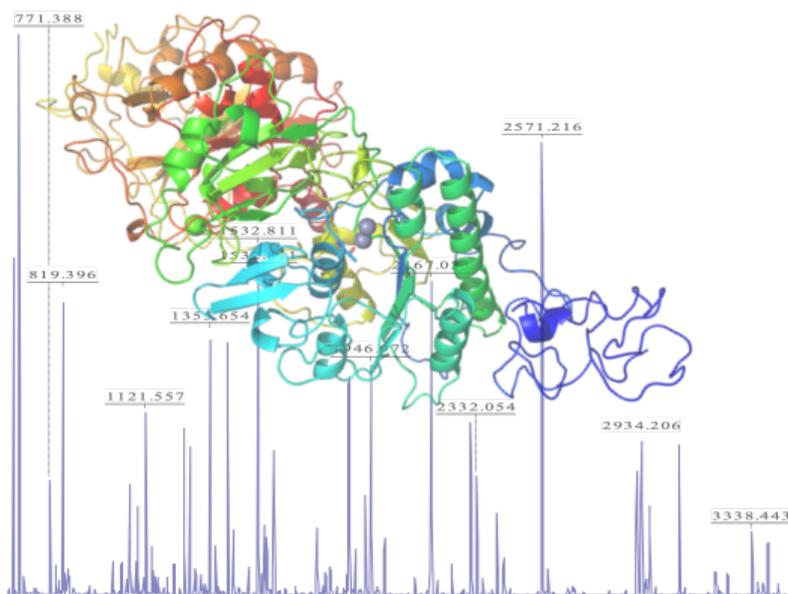
2. Objetivos

Os objetivos deste trabalho foram o isolamento e as caracterizações bioquímica, estrutural e funcional de uma PDE da peçonha de *C. d. collilineatus* (*CdcPDE*), visando ampliar o conhecimento sobre a ação de PDE de peçonhas ofídicas e, em função de suas atividades biológicas específicas, viabilizar seu uso como ferramenta molecular para estudar processos fisiopatológicos relacionados à esta classe de enzima.

Para isso foram realizadas as seguintes análises:

- Fracionamento da peçonha de *C. d. collilineatus* e isolamento da *CdcPDE* através de diferentes procedimentos cromatográficos, avaliando também sua atividade enzimática sobre o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* após cada procedimento;
- Determinação da massa molecular da *CdcPDE* por eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE, do inglês *Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrylamide Gel Electrophoresis*) e espectrometria de massas;
- Determinação de sua estrutura primária por sequenciamento aminoterminal e por diferentes métodos de espectrometria de massas;
- Identificação de glicosilações na estrutura da *CdcPDE* através de SDS-PAGE;
- Construção de seu modelo estrutural tridimensional e sua interação com o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*;
- Avaliação da atividade enzimática sobre o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* em diferentes pH, temperaturas e utilizando diferentes inibidores enzimáticos;
- Avaliação de seus parâmetros cinéticos sobre o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*;
- Avaliação da sua estabilidade após a perda de água e em diferentes condições de pH e salinidade
- Avaliação do reconhecimento da *CdcPDE* pelo soro anticrotálico comercial e a predição de seus epítomos imunogênicos;
- Determinação da inibição de plaquetas induzidas por ADP pela *CdcPDE*;
- Avaliação da citotoxicidade da *CdcPDE* em queratinócitos humanos.





3. Materiais e Métodos

Os ensaios utilizados na execução deste trabalho estão apresentados no fluxograma abaixo (Fig. 3) e serão posteriormente detalhados.

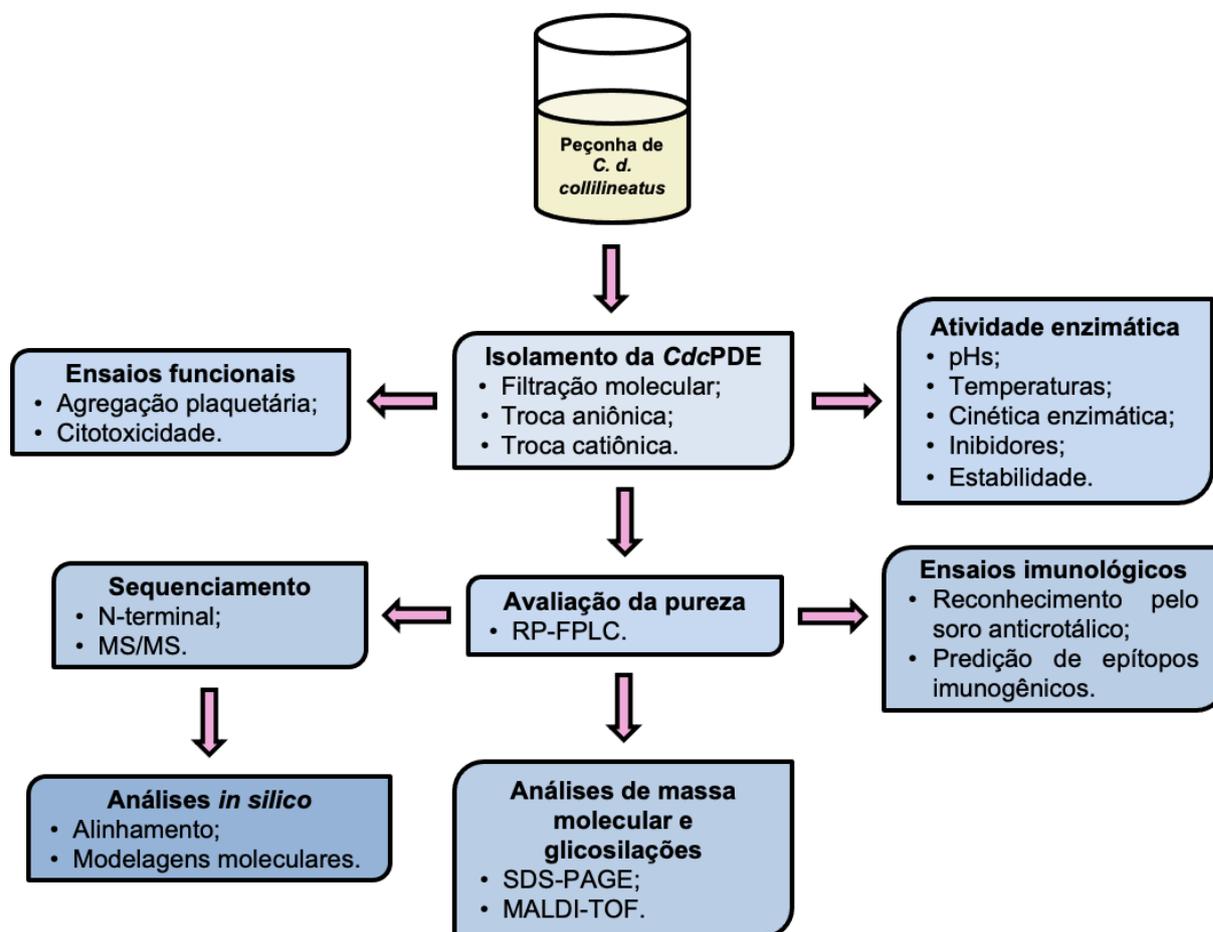


Figura 3. Fluxograma representativo das metodologias utilizadas para a execução do estudo.

3.1. Peçonhas ofídicas

As peçonhas ofídicas da subespécie *C. d. collilineatus* foram coletadas por compressão das glândulas de peçonha e, posteriormente, dessecadas em dessecador de vidro durante 6 horas e armazenadas a -20 °C até o momento do uso. Estas serpentes são oriundas da região de Catalão – GO e são mantidas no serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP, nº de registro: 1506748). O Anexo 1 apresenta o Certificado de Regularidade do Biotério Central, emitido pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).



3.2. Métodos cromatográficos para o isolamento da *CdcPDE*

Todos os métodos para a purificação da enzima *CdcPDE* foram realizados em sistema de Cromatografia Líquida Rápida de Proteínas (FPLC, do inglês *Fast Protein Liquid Chromatography*) Äkta Purifier UPC10 (GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e a absorvância da eluição foi monitorada automaticamente em 280 nm.

Após cada etapa cromatográfica, as frações de interesse passaram pelo processo de concentração em tubo Amicon Ultra-15 50K (Merck, São Paulo, Brasil), em centrífuga à 4 °C, 4.000 ×g, por aproximadamente 10 minutos. Este processo foi repetido até que o volume de amostra fosse reduzido a 1 mL.

3.2.1. Filtração molecular

A peçonha ofídica (90 mg) foi dispersa em 1 mL de tampão Tris hidrocloreto (Tris HCl) 50 mM e cloreto de sódio (NaCl) 150 mM, pH 8, e centrifugada a 13.000 ×g por 10 minutos, a 4 °C. O fracionamento do sobrenadante foi realizado em coluna de filtração molecular para ampla faixa de massa molecular de proteínas (HiPrep Sephacryl S-200 High resolution, ~5 a 250 kDa, 600 × 16 mm, partículas de 47 µm, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A eluição das frações foi realizada com gradiente isocrático de Tris HCl 50 mM e NaCl 150 mM, pH 8, sob vazão de 0,5 mL/min. Todas as 8 frações eluídas (S1-8) foram coletadas e congeladas para análises posteriores.

3.2.2. Troca aniônica

A fração S3, que, durante a cromatografia do item 3.2.1, apresentou maior atividade da enzima PDE (6 mg), foi fracionada através de uma coluna de troca aniônica (HiTrap ANX (high sub) Sepharose Fast Flow, 25 × 16 mm, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A eluição foi realizada sob gradiente segmentado de 0 a 100% do tampão B (Tris HCl 50 mM e NaCl 1 M, pH 8), sob vazão de 5 mL/min. Como tampão A foi utilizado Tris HCl 50 mM, pH 8. As 4 frações eluídas (A1-4) foram coletadas e congeladas para a análises posteriores.

3.2.3. Troca catiônica



A fração A1, que, durante a cromatografia do item 3.2.2, apresentou maior atividade da enzima PDE (0,7 mg), foi fracionada através de uma coluna de troca catiônica (Carboxymethyl cellulose-52, CMC-52, 100 × 10 mm, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). A eluição foi realizada sob gradiente segmentado de 0 a 100% do tampão B (acetato de sódio, CH₃COONa 50 mM e NaCl 1 M, pH 5), sob vazão de 0,5 mL/min. Como tampão A foi utilizado CH₃COONa 50 mM, pH 5. As 6 frações eluídas (C1-6) foram coletadas e congeladas para a análises posteriores.

3.3. Avaliação do grau de pureza

A fim de confirmar a purificação da *CdcPDE*, a fração C2, que, durante a cromatografia do item 3.2.3, apresentou maior atividade da enzima PDE (1 mg), foi avaliada através de uma coluna de fase reversa (C4 Jupiter, 250 × 4,6 mm, partículas de 5 μm, 300 Å, Phenomenex, Torrance, CA, EUA). A eluição foi realizada sob gradiente segmentado de 0 a 100% de solução B (acetonitrila, ACN 80% V/V, em ácido trifluoroacético, TFA 0,1% V/V), sob vazão de 1 mL/min. Como solução A foi utilizado TFA 0,1% (V/V). A única fração eluída foi coletada, congelada e liofilizada para a análises posteriores.

3.4. Quantificação de proteínas

A quantificação de proteínas de todas as amostras do estudo foi estimada pela determinação da absorbância da amostra em 280 nm ($\epsilon = 1,371 \text{ M}^{-1} \cdot \text{cm}^{-1}$) em espectrofotômetro NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA).

3.5. Avaliação da atividade fosfodiesterásica

A atividade fosfodiesterásica foi determinada seguindo o método proposto por Björk (1963), adaptado para microplaca de 96 poços, como descrito por Valério e colaboradores (2002), utilizando o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* e a *CdcPDE*. Esta metodologia consiste na incubação de 50 μL de amostra (frações coletadas dos processos cromatográficos) em 100 μL de Tris HCl 100 mM, pH 9, por 5 minutos, a 37 °C. Após este período, 100 μL de substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* 1 mM foram adicionados à mistura e, novamente, incubados por 15 minutos, a 37 °C. Em seguida, a reação foi interrompida com a adição de 50 μL de hidróxido



de sódio (NaOH) 50 mM. A leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm, em leitor de microplacas (Sunrise-basic, Tecan, Männedorf, Suíça). A atividade enzimática foi expressa em porcentagem de atividade relativa àquela de maior absorbância (fração cromatográfica com maior concentração de enzima).

A atividade específica foi determinada de acordo com Valério e colaboradores (2002), que considerou que o aumento de 1,0 Abs₄₀₀/min, corresponde a uma unidade de atividade enzimática.

3.6. SDS-PAGE

A peçonha (10 µg) e as frações que continham a enzima *CdcPDE* (5 µg) foram submetidas à SDS-PAGE (10%), seguindo o método proposto por Laemmli (1970), em condições desnaturantes (SDS), reduzidas (β-mercaptoetanol) e não reduzidas. Os géis foram corados com *Comassie Brilliant Blue* G-250 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA) e descorados com água destilada. Foram utilizados marcadores de baixa massa molecular (97,0 – 14,4 kDa, 17-0446-01, GE Healthcare, Uppsala, Suécia) e de ampla faixa de massas moleculares (120 – 10 kDa, M00516s, GenScript, New Jersey, EUA).

3.7. Determinação de massa molecular por MALDI-TOF

Este ensaio, bem como, todas as outras análises envolvendo espectrometria de massas foram realizadas durante o período de doutorado sanduíche no *Mass Spectrometry Laboratory*, da *Liège Université* (Bélgica), sob a orientação do Prof. Dr. Loïc Quinton.

A *CdcPDE* (10 µg) foi dessalinizada através de *Reversed-phase Zip Tip C4 column* (ref. ZTC04S096, Millipore, Burlington, MA, EUA), segundo instruções do fabricante e sua massa molecular foi determinada em espectrômetro de massas *matrix-assisted laser desorption/ionization* (MALDI), com analisador do tipo *time of flight* (TOF) analyzer (RapifleX, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA), utilizando o software flexControl 4.0 (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA), para a aquisição de dados. Os parâmetros empregados para a obtenção destes dados foram 10.000 laser *shots* por espectro, a frequência do laser foi de 500 Hz e o equipamento foi operado em modo linear positivo, com faixa de massas entre 20 e 220 kDa. RapifleX foi calibrado com soro albumina bovina (BSA, ~66 kDa [M+H]⁺, ~33 kDa [M+2H]²⁺ e dímero de BSA ~132 kDa [2M+H]⁺) e uma solução saturada de



ácido sinapínico, preparada em ACN 100% e TFA 0,1%, na proporção 3:7, foi utilizada como matriz. A análise destes dados foi realizada através do software flexAnalysis 3.4 (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA).

3.8. Determinação da estrutura primária da *CdcPDE*

3.8.1. Sequenciamento N-terminal

A fração correspondente a *CdcPDE* após cromatografia descrita no item 3.3 (30 µg) foi submetida a sequenciamento N-terminal, segundo método de degradação de Edman (EDMAN; BEGG, 1967), em um sequenciador automático de proteínas (PPSQ-33A, Shimadzu, Kyoto, Japão), conforme instruções do fabricante.

3.8.2. Análises por espectrometria de massas

3.8.2.1. *Peptide Mass Fingerprint (PMF)* e sequenciamento *de novo*

A *CdcPDE* (10 µg) foi submetida a redução com ditioneitol (DTT) 10 mM (10 µL), a 56 °C, por 40 minutos, sob agitação de 600 rpm, e alquilação com iodoacetamida (IAA) 20 mM (10 µL), à temperatura ambiente, por 30 minutos, no escuro. Após este período, uma segunda redução foi realizada com DTT 11 mM, à temperatura ambiente, por 5 minutos, no escuro. Esta amostra foi digerida com tripsina (ref. 90058, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), na proporção 1:50 de proteína, a 37 °C, *overnight*, sob agitação de 600 rpm. Em seguida, uma segunda digestão com a mesma enzima foi realizada, mas em diferentes proporção e tempo, 1:100 de proteína e 3 horas, a 37 °C, sob agitação de 600 rpm. A reação foi interrompida com TFA 0.5% e a amostra foi dessalinizada com *Reversed-phase Zip Tip C18 column* (ref. 87782, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), segundo instruções do fabricante.

O PMF foi determinado através do equipamento RapifleX, com o software flexControl 4.0 para a aquisição dos dados. RapifleX foi operado no modo refletido positivo e calibrado com uma mistura de peptídeos (Peptide calibration standard, ~1.000-3.200 Da, ref. 206195, Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA). Uma solução de ácido 2,5-diidroxibenzóico (DHB, 10 mg/mL) preparada em ACN 100% e TFA 0,1%, na proporção 1:1, foi utilizada como matriz.



A análise dos dados foi realizada através dos softwares flexAnalysis 3.4 e BioTools 3.2 (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA).

Os peptídeos trípticos foram submetidos a fragmentação MS/MS através do RapifleX, com o software flexControl 4.0 para a aquisição de dados. O equipamento foi operado no modo MS/MS e os espectros de MS/MS foram interpretados com o software BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2 (Bruker Corporation, Billerica, MA, EUA).

3.8.2.2. Cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas (LC-MS/MS)

A *CdcPDE* (10 µg) foi reduzida, alquilada, digerida com tripsina e dessalinizada como descrito no item 3.8.2.1.

Duas outras amostras de *CdcPDE* (10 µg cada) foram reduzidas e alquiladas como descrito no item 3.8.2.1 e submetidas a 2D Clean-up Kit (80-6484-51, GE Healthcare, Uppsala, Suécia), para a remoção de substâncias interferentes. Após este passo, as amostras foram submetidas à digestão multienzimática limitada (MELD, do inglês *Multi Enzymatic Limited Digestion*), que consiste em uma mistura de proteases, tripsina (ref. 90058, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), quimotripsina (ref. 90056, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA) e GluC (ref. 90054, Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA), em diferentes proporções, 1:85, 1:55 e 1:85 de proteína, respectivamente, a 37 °C, por duas horas, sob agitação de 600 rpm. Em uma, a reação foi interrompida com TFA 0,5% (concentração final), enquanto para a outra, a reação foi interrompida por aquecimento, (~100 °C), por 3 minutos. Esta última foi digerida com N-glicosidase F (ref 11365177001, lot 16070923, Roche, Basel, Suíça), sendo 5 U de N-glicosidase F:100 µg de proteína, a 37 °C, 600 rpm, durante 4 horas. Após este período, uma segunda digestão com a mesma enzima foi realizada, mas em proporção e tempo diferentes (3 U de N-glicosidase F:100 µg de proteína, *overnight*), a 37 °C, 600 rpm. Por fim, a reação foi interrompida com TFA 0,5% (concentração final).

Todas as amostras foram analisadas através do cromatógrafo Acquity UPLC® M-Class (Waters, Milford, MA, EUA), acoplado ao espectrômetro de massas Q-Exactive™ Plus Hybrid Quadrupole-Orbitrap™ (Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, EUA). Todos os espectros obtidos a partir da fragmentação MS/MS foram interpretados por sequenciamento *de novo* automático, através do software Peaks Studio 7 (Bioinformatics Solutions Inc., Waterloo, Canadá), comparados com bancos de dados criados por nosso grupo, gerados a partir do banco



de dados UniProt Knowledgebase (UniProtKB, <https://www.uniprot.org>), que consistia em sequências proteicas encontradas em peçonhas de serpente (9.421 sequências, “snake”) e sequências de PDE de peçonhas do gênero *Crotalus* sem o peptídeo sinal (17 sequências, “phosphodiesterase” e “Crotalus”). O erro tolerado para a massa dos íons precursor e a massa dos fragmentos foram de 5 ppm e 0,015 Da, respectivamente. A carbamidometilação de cisteínas foi determinada como modificação fixa, enquanto a amidação e a oxidação de metioninas foram consideradas modificações variáveis, sendo que poderia haver até 3 sítios de clivagem por peptídeos.

3.9. Alinhamento entre sequências

O alinhamento entre sequências foi realizado através de buscas por similaridades com PDE de peçonhas de serpentes já depositadas em bancos de dados, utilizando a ferramenta *Basic Local Alignment Search Tool* (BLAST, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) (ALTSCHUL et al., 1997, 2005).

Além disso, também foi realizado o alinhamento com PDE encontradas no proteoma de *C. d. terrificus* (WIEZEL et al., 2018), estudo anteriormente realizado em nosso laboratório. Para esta análise a ferramenta Multalin (<http://multalin.toulouse.inra.fr/multalin/>) (CORPET, 1988) foi utilizada.

3.10. Identificação de glicosilação por SDS-PAGE

A fração correspondente à *CdcPDE* após cromatografia descrita no item 3.3 foi submetida a SDS-PAGE para identificação de glicoproteínas.

Em dois tubos contendo 30 µg de *CdcPDE* cada foram adicionados 12 µL de bicarbonato de amônio 20 mM, pH 8. Além disso, também se adicionou 1 µL de SDS 5% e 1 µL de DTT 1 M. Estes tubos foram aquecidos a 95 °C por 10 minutos. Após este período, as amostras foram deixadas em repouso em temperatura ambiente até que chegassem nesta temperatura e foram adicionados 2 µL de Triton X-100 10%. Um dos tubos foi congelado a -20 °C para posterior análise, enquanto ao outro tubo foram adicionados 2 µL (10 U) de enzima PNGase F (V4831, Promega, Madison, WI, EUA) e incubado a 37 °C por 3 horas. Para finalizar a reação, esta amostra foi aquecida a 100 °C por 10 minutos e congelada a -20 °C, para posterior análise.



As duas amostras foram analisadas por SDS-PAGE 10%, como descrito no item 3.6.

3.11. Modelagens estruturais

A sequência primária da *CdcPDE* foi analisada quanto à presença de domínios usando a ferramenta de pesquisa de domínios conservados, NCBI Conserved Domains Search (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/wrpsb.cgi>) (MARCHLER-BAUER et al., 2015).

O modelo estrutural tridimensional da *CdcPDE* foi estimado através da ferramenta Swiss-Model (<https://swissmodel.expasy.org/>) (SCHWEDE et al., 2003), em modo automático (WATERHOUSE et al., 2018), baseado em outro modelo estrutural de PDE de peçonhas ofídicas já depositado em bancos de dados (PDB: 5GZ4, *Naja atra atra*).

A simulação de *docking* entre a *CdcPDE* e o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* foi realizada através da ferramenta SwissDock (<http://swissdock.ch>) (GROSDIDIER; ZOETE; MICHIELIN, 2011a, 2011b). A estrutura do substrato (PubChem CID: 255) e os dados da estrutura (SDF, do inglês *Structure Data File*) foram utilizados junto ao modelo estimado da *CdcPDE* descrito anteriormente para as simulações. Estas simulações foram visualizadas e analisadas através do software Chimera (<https://cgl.ucsf.edu/chimera>) (PETTERSEN et al., 2004). O modelo foi validado através dos servidores PROCHECK (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/PROCHECK/>) (LASKOWSKI et al., 1993, 1996) e ERRAT (<https://servicesn.mbi.ucla.edu/ERRAT/>) (COLOVOS; YEATES, 1993).

3.12. Avaliação da atividade fosfodiesterásica em diferentes pH

A atividade fosfodiesterásica foi determinada para a fração correspondente a *CdcPDE* (0,75 µg) obtida após isolamento cromatográfico descrito no item 3.2.3, frente a diferentes condições de pH. Foi empregado o método proposto por Bjork (1963), adaptado para microplaca de 96 poços, como descrito por Valério e colaboradores (2002), utilizando o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*. Os tampões utilizados foram Tris HCl 100 mM, pH 7, 7,5, 8, 8,5, 9 e 9,5 e o ensaio foi realizado a 37 °C.

Como controle negativo, a mesma quantidade de *CdcPDE* foi inativada por aquecimento (100 °C), por 10 minutos, e utilizada nas mesmas condições de cada ensaio.



Este ensaio foi realizado em triplicata, repetidos três vezes e a atividade enzimática foi expressa em porcentagem de atividade relativa ao pH de maior atividade ou maior absorbância. Os resultados foram analisados por análise de variância (ANOVA), seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.13. Avaliação da atividade fosfodiesterásica em diferentes temperaturas para o ensaio de atividade enzimática e armazenamento

A atividade fosfodiesterásica foi determinada para a fração correspondente a *CdcPDE* após isolamento cromatográfico descrito no item 3.2.3 (0,75 µg), frente a diferentes condições de temperatura. Foi empregado o método proposto por Bjork (1963), adaptado para microplaca de 96 poços, como descrito por Valério e colaboradores (2002), utilizando o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*. Foi utilizado o tampão Tris HCl 100 mM, pH 8 e as temperaturas do ensaio foram 0, 4, 25, 37 e 50 °C.

Além disso, a fração correspondente a *CdcPDE* após isolamento cromatográfico descrito no item 3.2.3 (0,75 µg) foi armazenada por 1 hora em diferentes temperaturas, -80, -20, 0, 4, 25, 37, 50 e 70 °C, e o ensaio de atividade foi realizado como descrito anteriormente, a 37 °C, em Tris HCl 100 mM, pH 8.

Como controle negativo, a mesma quantidade de *CdcPDE* foi inativada por aquecimento (100 °C), por 10 minutos, e utilizada nas mesmas condições de cada ensaio.

Estes ensaios foram realizados em triplicata, repetidos três vezes e a atividade enzimática foi expressa em porcentagem de atividade relativa às temperaturas de maior atividade ou maior absorbância. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.14. Avaliação da atividade fosfodiesterásica com diferentes inibidores

A atividade fosfodiesterásica foi determinada para a fração correspondente a *CdcPDE* após isolamento cromatográfico descrito no item 3.2.3 (0,75 µg), seguindo o método proposto por Bjork (1963), adaptado para microplaca de 96 poços, como descrito por Valério e colaboradores (2002), utilizando o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*. A enzima foi pré-incubada por 30 minutos, com diferentes inibidores, β-mercaptoetanol, cisteína, DTT e ácido



etilenodiamino tetra-acético (EDTA), em diferentes concentrações (0,625 – 10 mM). O ensaio foi realizado em tampão Tris HCl 100 mM, pH 8, a 37 °C.

Como controle negativo, a mesma quantidade de *CdcPDE* foi inativada por aquecimento (100 °C), por 10 minutos, e utilizada nas mesmas condições de cada ensaio. Como controle positivo, a mesma quantidade de *CdcPDE* foi incubada apenas com o tampão Tris HCl 100 mM, pH 8.

Este ensaio foi realizado em triplicata, repetidos três vezes e a atividade enzimática foi expressa em porcentagem de atividade relativa à maior atividade ou maior absorbância.

3.15. Avaliação dos parâmetros cinéticos

Os parâmetros da cinética enzimática foram avaliados na presença de concentrações diferentes do substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (0 – 5 mM) e a enzima *CdcPDE* (5 µg/poço). Os ensaios foram realizados a 37 °C e a hidrólise do substrato foi monitorada por espectrofotometria, em 400 nm, utilizando leitor de microplacas SpectraMax Plus 384 (Molecular Devices, San Jose, CA, USA EUA). As absorbâncias foram coletadas em intervalos de 3 segundos, durante 20 minutos.

Estes ensaios foram realizados em triplicata e os valores de velocidade máxima ($V_{m\acute{a}x}$), a constante de Michaelis (K_m) e número de *turnover* (k_{cat}) foram expressos em mM, considerando o coeficiente de extinção do produto formado de 17,6 M⁻¹.cm⁻¹ (AL-SALEH; KHAN, 2011) e determinados a partir de curva cinética hiperbólica de Michaelis-Menten, utilizando o software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software Inc., CA, EUA) e a seguinte equação:

$$V_0 = \frac{[E] \times k_{cat} \times [S]}{K_m + [S]}$$

- V_0 : velocidade inicial;
- [E]: concentração da enzima;
- [S]: concentração do substrato;
- k_{cat} : número de *turnover* (número de vezes que a enzima converte o substrato em produto por tempo);
- K_m : constante de Michaelis-Menten;
- $V_{m\acute{a}x}$: velocidade máxima da enzima ($[E] \times k_{cat}$);
- k_{cat}/K_m : eficiência catalítica

3.16. Avaliação da atividade fosfodiesterásica após perda de água



A atividade fosfodiesterásica foi determinada para a fração correspondente a *CdcPDE* após cromatografia descrita no item 3.2.1, seguindo o método proposto por Bjork (1963), adaptado para microplaca de 96 poços, como descrito por Valério e colaboradores (2002), utilizando o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*. Esta fração foi submetida a processos diferentes de perda de água, liofilização e secagem através de centrífuga rotatória a vácuo (SpeedVac, Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA). O ensaio foi realizado em tampão Tris HCl 100 mM, pH 8, a 37 °C.

Como controle positivo, a mesma fração não foi submetida a processos de perda de água e a atividade enzimática foi expressa em porcentagem de atividade relativa à maior atividade ou maior absorbância.

3.17. Avaliação da atividade fosfodiesterásica com diferentes concentrações de TFA

A atividade fosfodiesterásica foi determinada para a fração correspondente a *CdcPDE* após cromatografia descrita no item 3.2.1, seguindo o método proposto por Bjork (1963), adaptado para microplaca de 96 poços, como descrito por Valério e colaboradores (2002), utilizando o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*. Esta fração foi previamente incubada com diferentes concentrações de TFA (0,01 – 0,1%), por 30 minutos. O ensaio foi realizado em tampão Tris HCl 100 mM, pH 8, a 37 °C.

Como controle positivo, a mesma fração foi incubada com água e a atividade enzimática foi expressa em porcentagem de atividade relativa à maior atividade ou maior absorbância.

3.18. Avaliação da estabilidade térmica em diferentes condições de pH e salinidade

A estabilidade térmica da *CdcPDE* também foi avaliada através da técnica de *Termofluor*TM, utilizando termociclador em tempo real Mx3005P (Agilent Technologies, CA, EUA), com filtros específicos para medir sinais de fluorescência. Este ensaio foi realizado em colaboração com a Profa. Dra. Maria Cristina Nonato, do Laboratório de Cristalografia de Proteínas da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).

Em uma placa de 96 poços para reação em cadeia da polimerase (PCR) em tempo real (BioRad Laboratories, CA, EUA), 2 µL de *CdcPDE* (1 mg/mL), obtida do processo cromatográfico descrito no item 3.2.3, foram adicionados a 11 µL de água deionizada e 5 µL de diferentes soluções tamponantes, descritas a seguir. A essas amostras foram adicionados 2



μL do corante fluorescente *Sypro Orange Protein Gel Stain* (Thermo Fisher Scientific Inc., MA, EUA, 492/610 nm), na concentração de 50x (concentração não informada pelo fabricante). A placa foi selada e as amostras foram aquecidas de 25 a 95 °C, com aumentos graduais na temperatura a cada 1 °C/min. A intensidade de fluorescência foi plotada em função da temperatura e o ponto de inflexão das curvas permitiu a determinação da temperatura média de desenovelamento (T_m) da proteína, de acordo com o método descrito por Niesen e colaboradores (2007).

Neste ensaio foram utilizadas 96 condições tamponantes diferentes, utilizando água deionizada como referência e 11 tampões em 8 concentrações de NaCl (0, 50, 100, 150, 200, 250, 500 e 1000 mM). Os tampões utilizados na concentração de 50 mM foram: (i) CH_3COONa , pH 4,5; (ii) citrato de sódio, pH 5; (iii) ácido succínico, pH 5,5; (iv) ácido 2-etanossulfônico (MES), pH 6; (v) *bis*-Tris, pH 6,5; (vi) imidazol, pH 7; (vii) N-(2-hidroxietil)piperazina-N'-(2-ácido etanosulfônico) (HEPES), pH 7,5; (viii) Tris, pH 8; (ix) *bis*-Tris propano, pH 8,5; (x) 2-amino-2-metil-1,3-propanodiol (AMPD), pH 9 e (xi) glicina, pH 9,5.

3.19. Reconhecimento da *CdcPDE* pelo soro anticrotálico comercial

Para este reconhecimento foi realizado o ensaio imunoenzimático de *Enzyme-Linked Immunosorbent Assay* (ELISA) indireto, em microplaca de 96 poços de fundo plano (Costar®, Corning Incorporated, NY, EUA). Esta foi sensibilizada com 2 μg de *CdcPDE*, ou 2 μg de peçonha crotálica, diluídas em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6 (volume total por poço de 100 μL), e incubadas a 4 °C, por 16 horas. Como controle positivo, poços da placa foram sensibilizados com soro de cavalo não-imunizado (H0146, lote SLBS7574, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído 2:100 em tampão carbonato/bicarbonato 0,05 M, pH 9,6.

Após este período, o conteúdo dos poços foi descartado, a placa foi lavada três vezes com tampão fosfato salina (PBS), pH 7,2, e os poços foram bloqueados com 250 μL de leite em pó (Molico, São Paulo, SP, Brasil) 2% diluído em PBS (MPBS), por 2 horas, a 37 °C. Após a incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS e incubada a 37 °C, por uma hora, com 100 μL de soro anticrotálico comercial (soro anticrotálico, lote 1208195, Instituto Butantan), diluído 1:100 em MPBS 1%. Como controle negativo, alguns poços sensibilizados com *CdcPDE* e peçonha e foram incubados com 100 μL de soro de cavalo não imunizado diluído 1:100 em MPBS 1%. Após esta incubação, a placa foi lavada três vezes com PBS-*Tween* (PBS-



T) 0,05%, três vezes com PBS, e incubada com 100 µL de soro policlonal anti-cavalo marcados com peroxidase (*anti-horse*, IgG-HRP, A6917, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluídos 1:3.000 em MPBS 1%. Após uma hora de incubação à temperatura ambiente, a placa foi lavada como descrito anteriormente e em cada poço foram adicionados 100 µL de substrato OPD-H₂O₂ (SIGMAFAST OPD tablet, SLBM4528V, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), diluído em 20 mL de água deionizada e uréia (SIGMAFAST Buffer with urea H₂O₂, 021M8224, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), conforme instruções do fabricante, e aguardou-se 15 minutos para o desenvolvimento de cor ao abrigo de luz. A reação foi interrompida com 50 µL de H₂SO₄ 1 M (Merck, São Paulo, Brasil) e a leitura da absorbância foi realizada em 490 nm, em leitor de microplacas (Sunrise-basic Tecan, Suíça). O ensaio foi realizado em quadruplicata. Os resultados foram analisados por ANOVA, seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Tukey ($p < 0,05$).

3.20. Predição de epítomos imunogênicos na CdcPDE

A predição de epítomos imunogênicos que podem estar presentes na estrutura da CdcPDE foi realizada através da ferramenta ABCpred Server (<http://crdd.osdd.net/raghava/abcpred/>) (SAHA; RAGHAVA, 2006), tendo um limiar de 0,9 e cada epítomo deveria ter entre 14 a 16 resíduos.

3.21. Ensaio de agregação plaquetária

O ensaio de agregação plaquetária foi realizado após aprovação do projeto de pesquisa pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da FCFRP/USP, sob protocolo n°. 435 – CAAE n°. 64850717.8.0000.5403, e em colaboração com a Profa. Dra. Suely Vilela, do Laboratório de Toxinologia da FCFRP/USP.

Foram coletadas amostra de sangue venoso humano (~10 mL) de voluntários entre 20 e 40 anos de idade, sadios, que não faziam uso de medicações que pudessem interferir no processo de coagulação sanguínea e que estivessem de acordo com o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE). Estas amostras foram coletadas em tubos Vacutainer, com citrato de sódio 105 mM como anticoagulante (BD Biosciences, Franklin Lakes, Nova Jersey, EUA).

O sangue coletado foi submetido à centrifugação a 1.000 rpm por 10 minutos para a separação dos eritrócitos e obtenção do plasma rico em plaquetas (PRP).



Este ensaio foi realizado por turbidimetria utilizando agregômetro ótico (Chrono-Log Corporation, Havertown, PA, EUA). A suspensão de PRP (450 μL) foi incubada a 37 °C em cubetas de vidro siliconizadas sob agitação por 5 minutos. Em seguida, 50 μL de solução contendo diferentes concentrações de *CdcPDE* (0,015 – 0,12 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram adicionados ao PRP e a agregação foi monitorada por 6 minutos. A capacidade da *CdcPDE* de inibir a agregação plaquetária foi avaliada através da adição de um agonista de agregação plaquetária, o ADP (2,4 μM). O ensaio foi realizado em triplicata e os resultados foram analisados por ANOVA, seguida de uma análise *post-hoc* por meio do teste de Dunnett ($p < 0,05$).

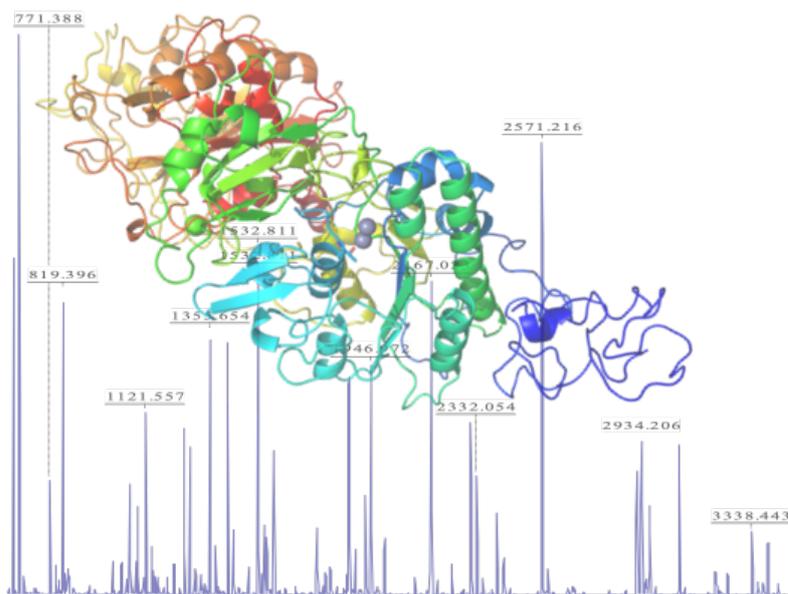
3.22. Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos humanos (N/TERT)

Este ensaio foi realizado durante outro estágio no exterior em colaboração com o Prof. Dr. Ulrich auf dem Keller e o Prof. Dr. Andreas Hougaard Laustsen, da *Technical University of Denmark* (Dinamarca).

Queratinócitos humanos imortalizados (células N/TERT, 4×10^3) foram incubados em placas opacas pretas de poliestireno de 96 poços (ref. 237105, Thermo Fisher Scientific, Roskilde, DK), com meio de cultura *Dulbecco's modified Eagle's medium* (DMEM: F12; Grand Island, NY, EUA), penicilina-estreptomicina 1%, suplementado com RMplus 1X e soro fetal bovino 10%, a 37 °C, com 5% de CO_2 e 85% de umidade, *overnight*. Em seguida, foi realizada troca de meio de cultura para um novo meio contendo *CdcPDE* em diferentes concentrações (10 – 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). A placa foi novamente incubada nas mesmas condições por 24 horas.

A viabilidade celular foi determinada através do *kit* CellTiter-Glo[®] Luminescent Cell Viability Assay (ref. G7570, Promega, Madison, WI, EUA), de acordo com instruções do fabricante, enquanto o valor de IC_{50} foi determinado pelo software GraphPad Prism 8 (GraphPad Software Inc., CA, EUA), através do $\log(\text{CdcPDE})$ versus resposta normalizada e pela equação de Hill (PUCCA et al., 2020).





4. Resultados e Discussão

Anteriormente, foi realizada por nosso grupo de pesquisa, uma análise proteômica da peçonha de *C. d. collilineatus*, com o objetivo de verificar se haviam variações intraespecíficas, entre 22 indivíduos desta subespécie. Foi observado que haviam variações qualitativas, como a presença ou ausência da crotamina, quanto quantitativas, como as diferentes proporções de crotoxina observadas nas peçonhas. Observou-se que estas diferenças poderiam levar a alterações na quantidade de biomarcadores durante o quadro do envenenamento (OLIVEIRA et al., 2019).

Além disso, também foi possível observar a presença de proteínas, até então, não determinadas nesta peçonha, como 5'-nucleotidase, enzima conversora de angiotensina, fosfolipase B, carboxipeptidase, glutaminil ciclase, crotocetina, glutathione peroxidase, NADH desidrogenase e PDE (OLIVEIRA et al., 2019).

Visto que existem ainda poucos estudos a respeito das PDE oriundas de peçonhas de serpente e sua ocorrência na peçonha de *C. d. collilineatus*, estes fatores nos motivaram a isolá-la e caracterizá-la, a fim de contribuir para ampliar o conhecimento desta classe enzimática.

4.1. Isolamento da *CdcPDE*

A purificação de proteínas é um processo laborioso, que muitas vezes envolve diversas etapas cromatográficas, acarretando em custo e tempo elevados. Portanto, torna-se necessário o desenvolvimento de processos de purificação mais rápidos e eficientes, tanto para a indústria quanto para a pesquisa ainda na bancada (KAVEH-BAGHBADERANI et al., 2018).

A purificação da PDE de outras espécies de serpentes através de métodos cromatográficos já foi descrita por outros autores, consistindo em três a cinco passos (MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; VALÉRIO et al., 2002; TRUMMAL et al., 2014). Existem relatos da purificação da PDE através apenas de PAGE nativa (AL-SALEH; KHAN; ASHRAF, 2009; AL-SALEH; KHAN, 2011). A escolha por metodologias empregadas na purificação de toxinas é definida de acordo com as propriedades físico-químicas das moléculas de escolha, bem como, pelas peculiaridades que as peçonhas e venenos apresentam.

No presente estudo, o isolamento da *CdcPDE* foi possível através de três passos cromatográficos, sendo o primeiro realizado em uma coluna de filtração molecular, como descrito no item 3.2.1, no qual foram obtidas 8 frações (S1 a S8). Esta técnica separa proteínas pelas diferenças no tamanho molecular (NELSON; COX, 2014a), desta forma, a mesma foi utilizada para que a *CdcPDE* pudesse ser separada de componentes menores, que são os



componentes majoritários desta peçonha, como por exemplo, a crotoxina, complexo enzimático que constitui 65% a 68% da peçonha (DA SILVA; BIER, 1982). Após esta etapa foi realizado ensaio de atividade enzimática utilizando um substrato específico, *bis(p-nitrofenil)-fosfato*, como descrito no item 3.5, para determinar em qual das frações foi eluída a enzima *CdcPDE*, sendo esta escolhida para as próximas etapas cromatográficas e posteriores análises. Os resultados estão apresentados na figura 4.

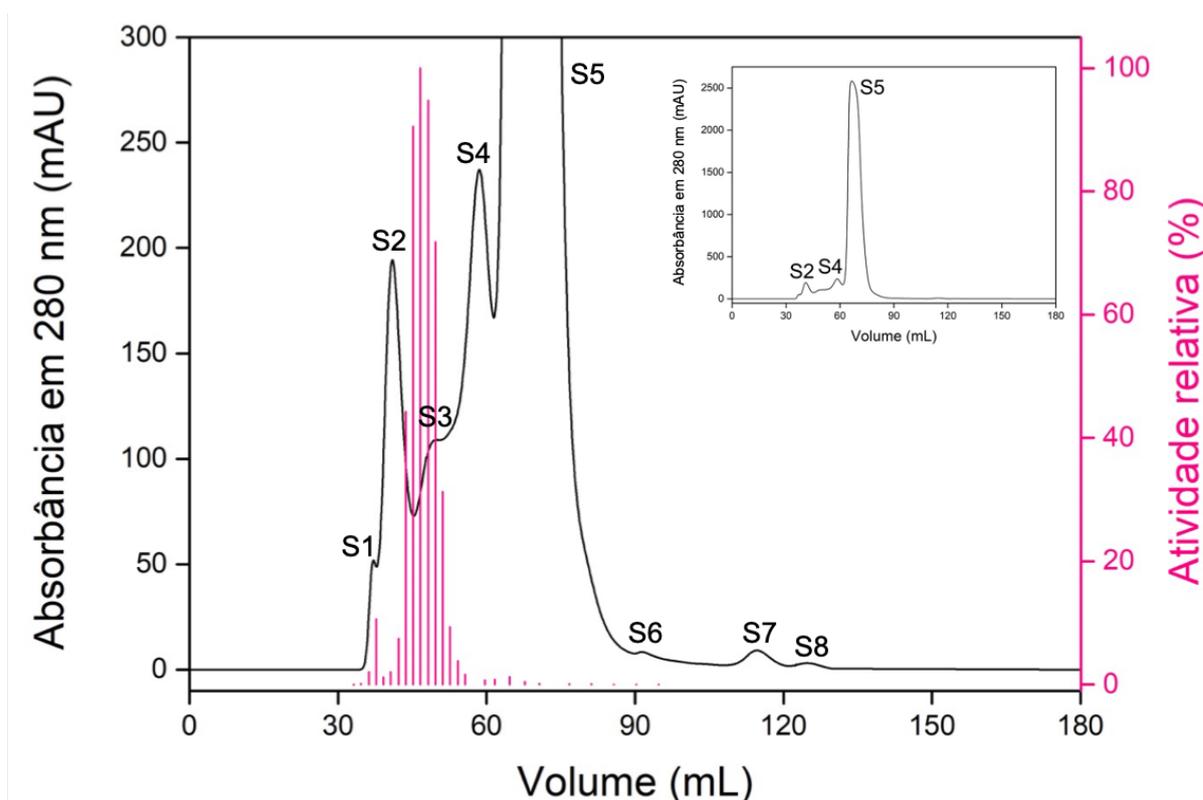


Figura 4. Perfil cromatográfico da peçonha de *C. d. collilineatus* em coluna de filtração molecular e atividade enzimática. A peçonha bruta (90 mg) foi fracionada em coluna HiPrep Sephacryl S-200 High resolution conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC10, sob vazão de 0,5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente isocrático de Tris HCl 50 mM e NaCl 150 mM, pH 8. A atividade fosfodiesterásica de cada fração eluída (proporcional à absorbância em 400 nm) está representada em rosa. Para a realização do ensaio de atividade, o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (1 mM) foi adicionado à mistura de amostras (50 μ L de cada tubo coletado) e tampão (Tris HCl 100 mM, pH 9). Após 15 minutos, a 37 $^{\circ}$ C, a reação foi interrompida e a leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm. Inseto: perfil cromatográfico geral sem ampliação.

A partir desta cromatografia, foram obtidas frações que apresentam a *CdcPDE* (S1 a S3). Entretanto, pode-se observar que a fração S3 é a que apresenta maior atividade enzimática (Fig. 4), sendo esta fração a escolhida para as próximas etapas cromatográficas.

Após este primeiro passo cromatográfico para o isolamento da enzima *CdcPDE*, foi realizada cromatografia em uma coluna de troca aniônica, como descrito no item 3.2.2, na qual foram obtidas 4 frações, A1 a A4 (Fig. 5). Esta técnica cromatográfica separa proteínas de



acordo com suas cargas, utilizando um trocador aniônico (NELSON; COX, 2014a), que neste caso foi o $-O-CH_2CHOHCH_2OCHCHOHCH_2N^+H(CH_2CH_3)_2$, que constitui uma resina de troca aniônica fraca (GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Após esta etapa também foi realizado ensaio de atividade enzimática utilizando um substrato específico, *bis(p-nitrofenil)-fosfato*, como descrito no item 3.5, para determinar em qual das frações foi eluída a enzima *CdcPDE*, sendo esta escolhida para as próximas etapas cromatográficas e posteriores análises.

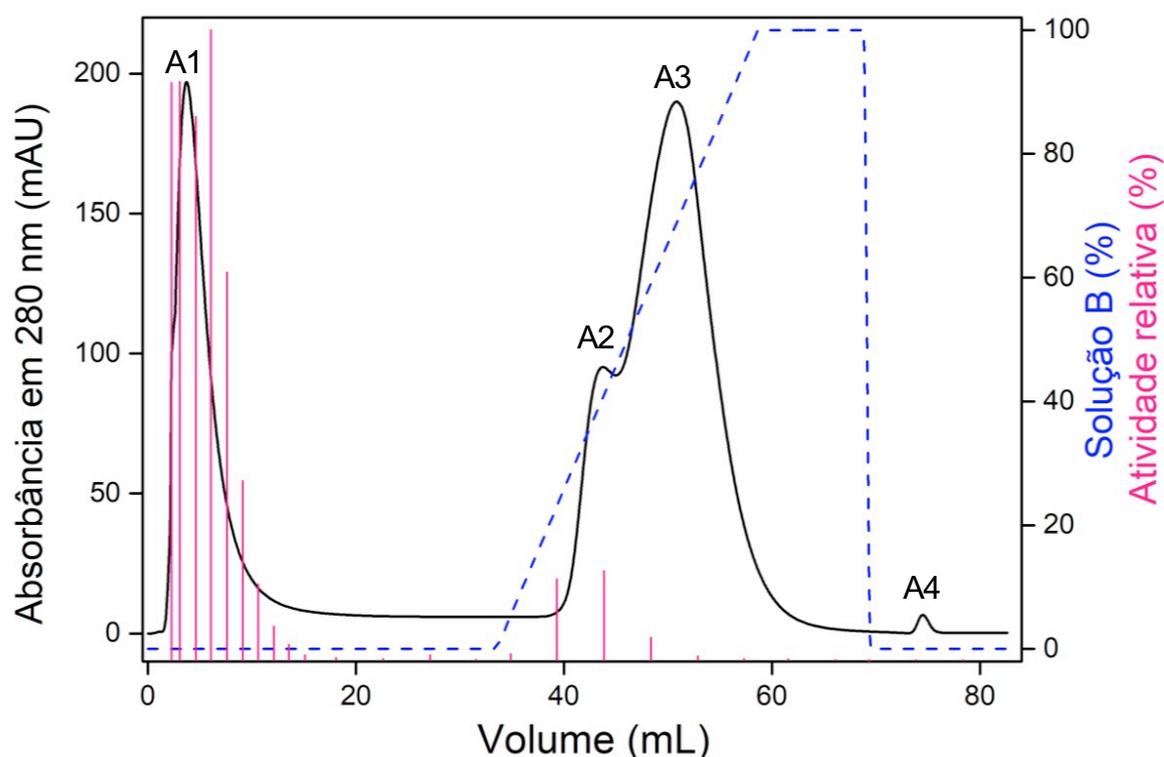


Figura 5. Perfil cromatográfico da fração S3 em coluna de troca aniônica e atividade enzimática. A fração S3 (6 mg) foi fracionada em coluna HiTrap ANX (high sub) Sepharose Fast Flow conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC10, sob vazão de 5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de 0 a 100% do tampão B (Tris HCl 50 mM e NaCl 1 M, pH 8, representado pela linha tracejada azul). Como tampão A foi utilizado Tris HCl 50 mM, pH 8. A atividade fosfodiesterásica de cada fração eluída (proporcional à absorbância em 400 nm) está representada em rosa. A atividade fosfodiesterásica de cada fração eluída (proporcional à absorbância em 400 nm) está representada em rosa. Para a realização do ensaio de atividade, o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (1 mM) foi adicionado a uma mistura de amostras (50 μ L de cada tubo coletado) e tampão (Tris HCl 100 mM, pH 9). Após 15 minutos, a 37 $^{\circ}$ C, a reação foi interrompida e a leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm.

Considerando o pI das PDE já descritas, entre 7,4 e 10,5 (PHILIPPS, 1975; MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; VALÉRIO et al., 2002; AL-SALEH; KHAN, 2011), e o pH da solução utilizada neste processo cromatográfico, pH 8, presume-se que o pI da *CdcPDE* deve ser bem próximo a 8, visto que, após o ensaio de atividade enzimática, a fração que corresponde à proteína *CdcPDE* é aquela que não interagiu com a coluna, sendo eluída logo no início da



cromatografia. Ou seja, neste pH, a *CdcPDE* não adquiriu carga líquida negativa, para que pudesse interagir com a coluna. Entretanto, os contaminantes foram capazes de interagir, pois adquiriram carga neste pH, o que facilitou o processo de purificação da *CdcPDE*.

Partindo deste mesmo princípio de separação de proteínas através de sua carga, o próximo passo de purificação utilizado foi a cromatografia de troca catiônica, que também separa proteínas de acordo com sua carga (NELSON; COX, 2014a). O trocador catiônico utilizado neste procedimento foi o $-O-CH_2COO^-$, que constitui uma resina de troca catiônica fraca (Carboxymethyl cellulose-52, GE Healthcare, Uppsala, Suécia). Nesta cromatografia foram obtidas 6 frações, denominadas C1 a C6 (Fig. 6). Após ensaio atividade enzimática utilizando o substrato específico, *bis(p-nitrofenil)-fosfato*, constatou-se que a fração C2 é aquela que apresenta maior atividade enzimática, sendo esta escolhida para as análises posteriores.

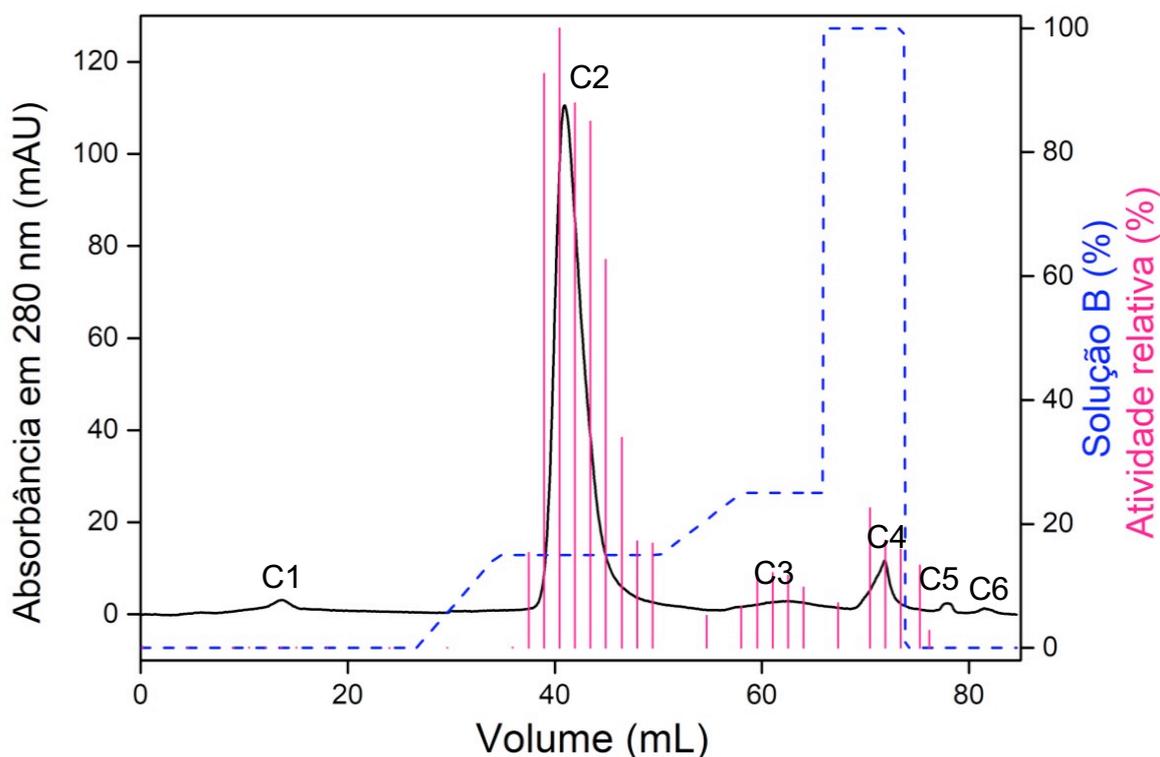


Figura 6. Perfil cromatográfico da fração A1 em coluna de troca catiônica e atividade enzimática. A fração A1 (0,7 mg) foi fracionada em coluna Carboxymethyl cellulose-52, conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC10, sob vazão de 0,5 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de 0 a 100% do tampão B (CH_3COONa 50 mM e $NaCl$ 1 M, pH 5, representado pela linha pontilhada azul). Como tampão A foi utilizado CH_3COONa 50 mM, pH 5. A atividade fosfodiesterásica de cada fração eluída (proporcional à absorbância em 400 nm) está representada em rosa. A atividade fosfodiesterásica de cada fração eluída (proporcional à absorbância em 400 nm) está representada em rosa. Para a realização do ensaio de atividade, o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (1 mM) foi adicionado a mistura de amostras (50 μ L de cada tubo coletado) e tampão (Tris HCl 100 mM, pH 9). Após 15 minutos, a 37 °C, a reação foi interrompida e a leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm.



A utilização deste tipo de cromatografia, em pH 5, indica que a proteína *CdcPDE* deve ter pI maior que 5,0, apresentando carga positiva neste pH, o que permite sua interação com a resina. Com o aumento da concentração de sal (aumento da força iônica), a *CdcPDE* foi eluída.

A fim de verificar se a *CdcPDE* já se encontrava isolada dos demais componentes da peçonha crotálica, foi realizada sua cromatografia em coluna de fase reversa C4, como descrito no item 3.2.4. Através do perfil cromatográfico obtido (Fig. 7), evidenciando apenas um pico de eluição relevante, foi possível hipotetizar que após o terceiro passo cromatográfico, a cromatografia de troca catiônica, a *CdcPDE* já se encontrava com elevado teor de pureza. Uma vez que a fração C2 corresponde à *CdcPDE* com elevado teor de pureza e ativa (Fig. 6), esta fração foi usada nos ensaios enzimáticos e funcionais. Embora a atividade PDE não tenha sido detectada através do ensaio de atividade enzimática, após a cromatografia de fase reversa, esta etapa adicional foi usada para garantir a pureza da *CdcPDE*. Esta proteína com elevado teor de pureza (R) foi usada apenas nos ensaios em que a atividade enzimática não era relevante, como espectrometria de massa e outros ensaios de caracterização estrutural, por exemplo, SDS-PAGE.

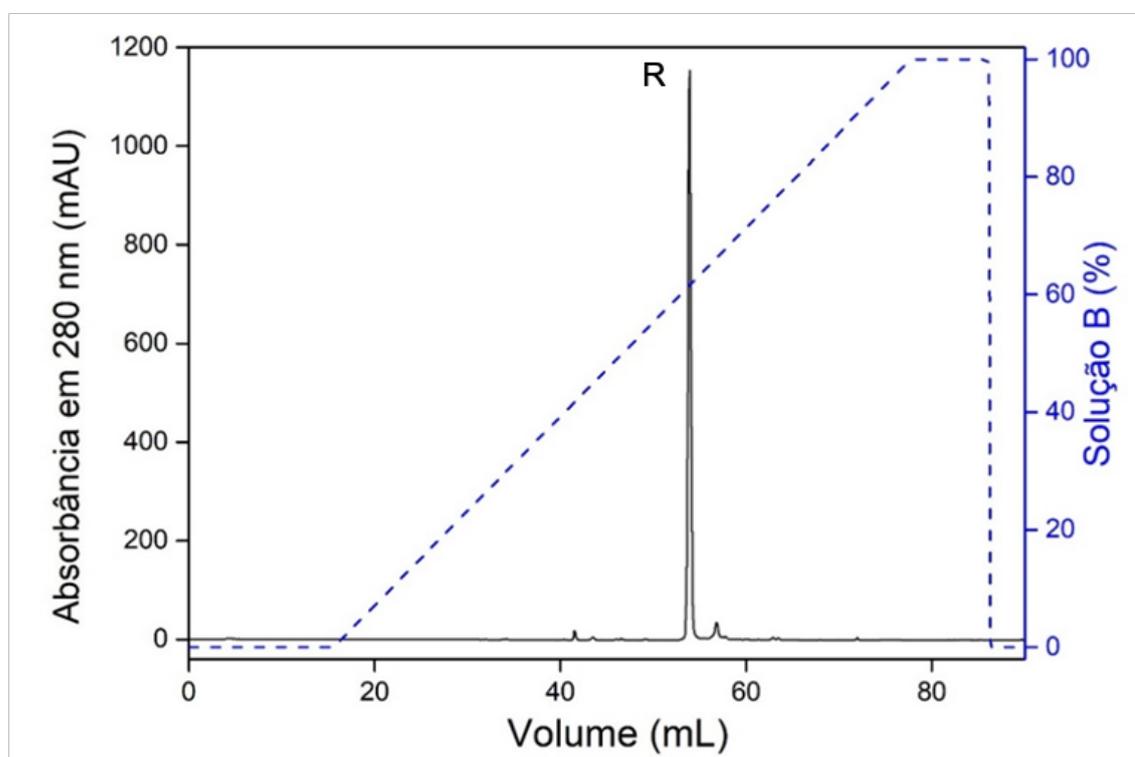


Figura 7. Perfil cromatográfico da fração C2 em coluna de fase reversa C4. A fração C2 (1 mg) foi submetida à cromatografia de fase reversa em coluna C4 (250 × 4,6 mm, partículas de 5 μm, 300 Å, Phenomenex), conectada a um sistema FPLC Äkta Purifier UPC10, sob vazão de 1 mL/min. A eluição das frações foi realizada com gradiente segmentado de ACN 80% (V/V) em TFA 0,1% (V/V), como solução B (representado pela linha pontilhada vermelha), e TFA 0,1% (V/V), como solução A.



Tendo sido completado todo o processo de purificação da *CdcPDE*, é importante ressaltar que esta sequência de processos cromatográficos, filtração molecular e trocas iônicas, já foi reportado por outros autores que também visavam o isolamento da PDE de outras espécies de serpentes (SUGIHARA et al., 1986; MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; TRUMMAL et al., 2014).

A partir destas etapas de purificação foi possível também determinar o rendimento da *CdcPDE* neste *pool* de peçonhas. É possível observar que a *CdcPDE* corresponde a 0,7% da peçonha de *C. d. collilineatus* (Tab. 3). O rendimento desta enzima em outras peçonhas também mostrou-se muito baixo, menor que 1%, como é o caso nas peçonhas de *C. r. ruber*, *T. mucrosquamatus* e *D. russelli* (SUGIHARA et al., 1986; MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; MITRA; BHATTACHARYYA, 2014). Desta forma, os processos cromatográficos foram repetidos várias vezes, a fim de obter quantidade suficiente de *CdcPDE* para a realização de todos os ensaios propostos.

Tabela 3. Recuperação proteica da *CdcPDE* durante as etapas de purificação.

Amostra	Etapas de purificação	Recuperação (%)*	Massa (mg)	Atividade total (UAE)	Atividade específica (UAE/mg)
Peçonha bruta	Solubilização	100	90	125,10	1,39
S3	Filtração molecular	2,87	2,58	68,89	27,09
A1	Troca aniônica	0,83	0,75	106,49	141,99
C2	Troca catiônica	0,71	0,64	68,80	107,50

UAE: unidades de atividade enzimática.

*Porcentagem de recuperação calculada através do software Unicorn 5.2 (GE Healthcare), de acordo com a relação entre a área sob a curva de absorbância em 280 nm de cada fração correspondente e a soma das áreas de todas as frações eluídas.

4.2. Caracterização estrutural

Após o processo de purificação da *CdcPDE*, foram realizadas SDS-PAGEs a 10% de acrilamida (Fig. 8). Nesta porcentagem de acrilamida, proteínas maiores que 300 kDa ficam retidas na parte superior do gel, enquanto as proteínas menores migram com diferentes mobilidades, dependendo de suas massas moleculares, e podem ser visualizadas como diferentes bandas eletroforéticas (LAEMMLI, 1970). Como descrito no item 3.6, foram realizadas eletroforeses das etapas cromatográficas do processo de purificação da *CdcPDE*, tanto em condições não reduzidas, como em condições reduzidas por β -mercaptoetanol. Nestes géis foi confirmado que após a cromatografia de troca catiônica a *CdcPDE* já se encontra



isolada das demais proteínas. Além disso, também pode ser afirmado que a *CdcPDE* migrou como um monômero, como as PDE encontradas nas peçonhas de *Agistrodon bilineatus* (AL-SALEH; KHAN; ASHRAF, 2009) e *B. alternatus* (VALÉRIO et al., 2002), o que caracteriza as PDE de classe 1 (AL-SALEH; KHAN; ASHRAF, 2009).

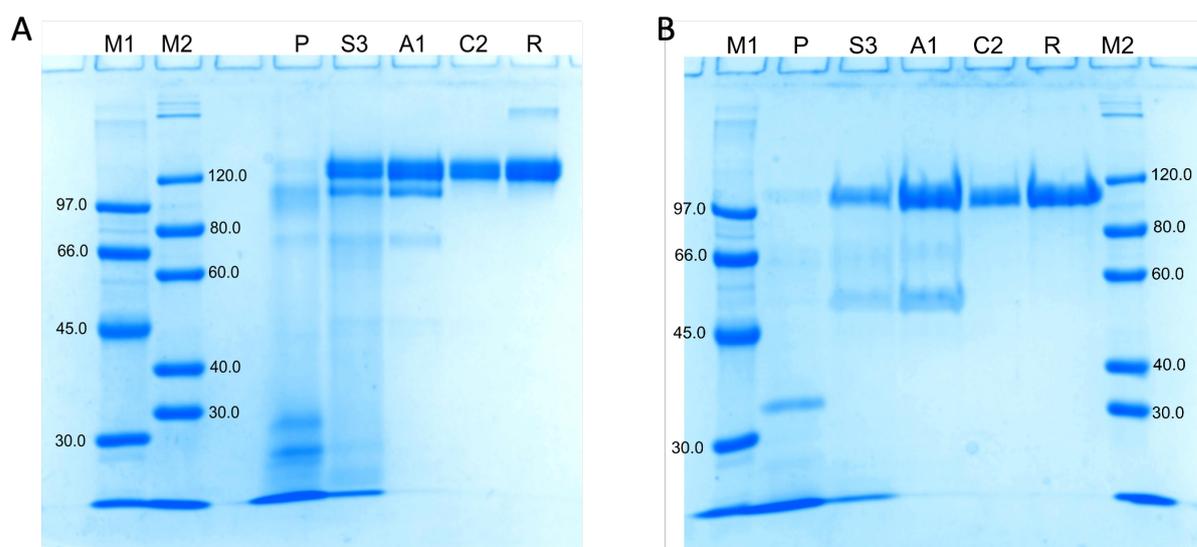


Figura 8. Perfil eletroforético das frações obtidas nas etapas de purificação da *CdcPDE*. SDS-PAGE (10%) em condições desnaturantes. **(A)** Condições não redutoras; **(B)** Condições redutoras; M1: marcador de massa molecular (97,0 – 14,4 kDa); P: peçonha de *C. d. collilineatus* (10 µg); S3: fração 3 obtida em cromatografia de filtração molecular (5 µg); A1: fração 1 obtida em cromatografia de troca aniônica (5 µg); C2: fração 2 obtida em cromatografia de troca catiônica (5 µg); R: fração obtida em cromatografia de fase reversa (5 µg); M2: marcador de ampla faixa de massas moleculares (120 – 10 kDa).

Através de SDS-PAGE foi possível ter uma estimativa do tamanho da proteína em questão, mas este resultado não é tão preciso quanto um ensaio de espectrometria de massas, por exemplo. Desta forma, a análise da massa molecular da *CdcPDE* foi realizada, como descrito no item 3.7. Como resultado, foram observadas duas massas moleculares na amostra, 100.330 Da e 105.598 Da (Fig. 9).



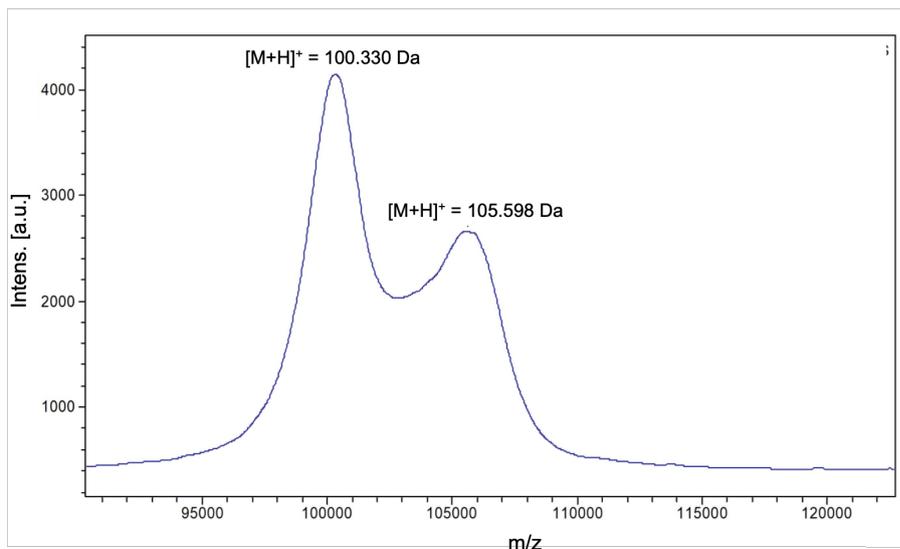


Figura 9. Massa molecular da *CdcPDE* determinada por MALDI-TOF. A massa molecular da *CdcPDE* foi determinada através de espectrometria de massas (MALDI-TOF), utilizando o software flexControl 4.0 e flexAnalysis 3.4, para aquisição e análise de dados, respectivamente.

A partir destes resultados, foi possível observar que a *CdcPDE* apresenta massa molecular similar a de outras PDE monoméricas já descritas, tais como PDE oriundas das peçonhas de *Cerastes cerastes* (110.000 Da) (HALIM et al., 1987) e *B. alternatus* (105.000 Da) (VALÉRIO et al., 2002). Entretanto, estas duas últimas foram determinadas por SDS-PAGE, sendo a metodologia empregada em nosso estudo mais precisa. Além disso, é possível que existam duas isoformas de *CdcPDE* nesta peçonha crotálica, visto que existem duas massas moleculares nos espectros resultantes, ou uma mesma isoforma, porém com quantidades distintas de modificações pós-traducionais em sua estrutura, se houver, como, por exemplo, as glicosilações.

Para a caracterização estrutural em relação à estrutura primária da *CdcPDE*, o sequenciamento amino-terminal, pelo método de degradação de Edman, e técnicas de espectrometria de massas foram aplicadas neste estudo, como descrito no item 3.8.

O método de degradação de Edman consiste em uma reação iniciada pela marcação do aminoácido N-terminal da proteína, que é removido e identificado, o que não interfere nas outras ligações peptídicas da proteína. Neste ensaio ocorre a reação do peptídeo com fenilisotiocianato em condições alcalinas, gerando um aduto de feniltiocarbamoil (PTC) no aminoácido aminoterminal. Já em TFA anídrico, a ligação peptídica próxima a este aduto é clivada, o que remove o resíduo N-terminal, como um derivado anilinoiazolinona. Extraído por solventes orgânicos, este resíduo é convertido a uma forma mais estável, um derivado de feniltiodantoína, em solução aquosa ácida e, após todo este processo controlado por soluções



básicas e ácidas, o resíduo é identificado pela eluição em cromatografia de fase reversa (NELSON; COX, 2014a; STRACK, 2015). Como resultado da metodologia descrita no item 3.8.1, foram obtidos os 26 primeiros resíduos de aminoácidos.

Técnicas de espectrometria de massas são amplamente utilizadas para a análise de biomoléculas, tais como peptídeos e proteínas (YATES, 2000), e não apenas para sua identificação, mas também permite que as massas moleculares destes componentes sejam determinadas, como demonstrado anteriormente, bem como as modificações pós-traducionais (QUINTON et al., 2006). Entre estas técnicas, é importante destacar o *Peptide Mass Fingerprint* (PMF), o qual permite a identificação de proteínas mais rapidamente, após digestão enzimática, a qual gera peptídeos que terão suas massas moleculares determinadas, caracterizando o PMF (PAPPIN; HOJRUP; BLEASBY, 1993). Assim, esta metodologia foi aplicada em nosso estudo, como descrito no item 3.8.2.1 e o PMF da *CdcPDE* está representado na figura 10.

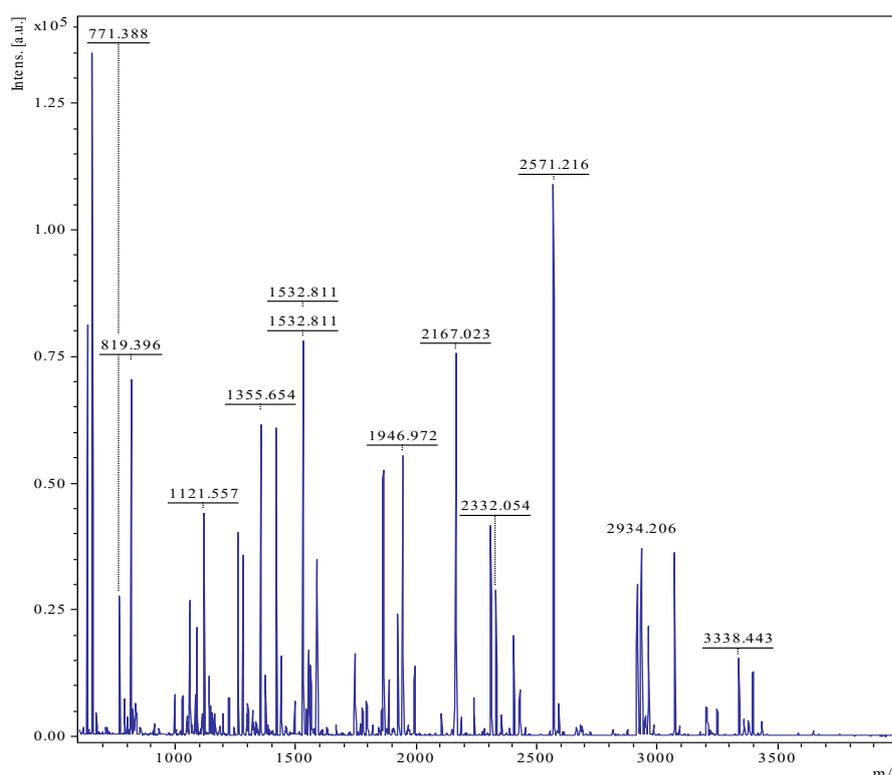


Figura 10. *Peptide mass fingerprint* (PMF) da *CdcPDE* digerida. O PMF foi analisado por MALDI-TOF e pelo software flexAnalysis 3.4.

Além destas análises, três outras metodologias que fazem uso de digestão enzimática e LC-MS/MS foram utilizadas, com a intenção de obter a sequência de aminoácidos que constitui



a *CdcPDE*. Entre estas digestões enzimáticas, estão a digestão com tripsina, a MELD, e a MELD seguida de digestão com N-glicosidase F como descritas no item 3.8.2.2.

Quando comparada a digestão tríptica, a MELD apresenta algumas vantagens, tais como, alta diversidade dos peptídeos, uma vez que são digeridos por outras enzimas, que tem outros sítios de clivagem. Entre estas enzimas estão: (i) quimotripsina, que hidrolisa fenilalanina (F), tirosina (Y) e triptofano (W) na porção C-terminal e, em baixas proporções, metionina (M) e leucina (L); (ii) GluC, que hidrolisa resíduos de ácido glutâmico (E) e ácido aspártico (D), também na porção C-terminal, além de; (iii) tripsina, que é comum em ambas as digestões, hidrolisando resíduos de lisina (K) e arginina (R) na porção C-terminal. Adicionalmente, estas enzimas podem gerar um alto número de peptídeos, levando a uma maior cobertura das proteínas, podendo estes peptídeos se sobrepor, facilitando o sequenciamento de novas proteínas, formando um “quebra-cabeça” de fácil resolução (MORSA et al., 2019). Como esperado, os resultados obtidos pela digestão por MELD e MELD seguida de digestão com N-glicosidase F, mostram que foram obtidos quase três vezes mais espectros, enquanto os números de peptídeos obtidos por estas digestões também foram quase cinco e sete vezes maiores, respectivamente (Tab. 4).

Tabela 4. Comparação entre os números de espectros e peptídeos obtidos a partir das diferentes digestões enzimáticas.

Método	Espectros	Peptídeos
Tripsina	29.086	1.822
MELD	82.481	8.889
MELD + N-glicosidase F	82.955	13.062

Com a união de todos estes resultados (obtidos por sequenciamento N-terminal e por espectrometria de massas), foi possível determinar uma sequência para a *CdcPDE* deste estudo, a qual é formada por 829 resíduos de aminoácidos.

É importante ressaltar que todos os resultados relacionados a sequência de aminoácidos devem ser combinados. A possível sequência da *CdcPDE*, obtida através de sequenciamento N-terminal e LC-MS/MS, deve ser combinada com os resultados obtidos pelo PMF. Desta forma, estes resultados foram combinados pelo software BioTools 3.2 e foi possível observar que os peptídeos oriundos do PMF foram capazes de cobrir quase 72% da sequência proposta (Fig. 11). Além disso, a fragmentação dos peptídeos correspondentes também foi realizada e estão representas nas figuras de 12 a 21.



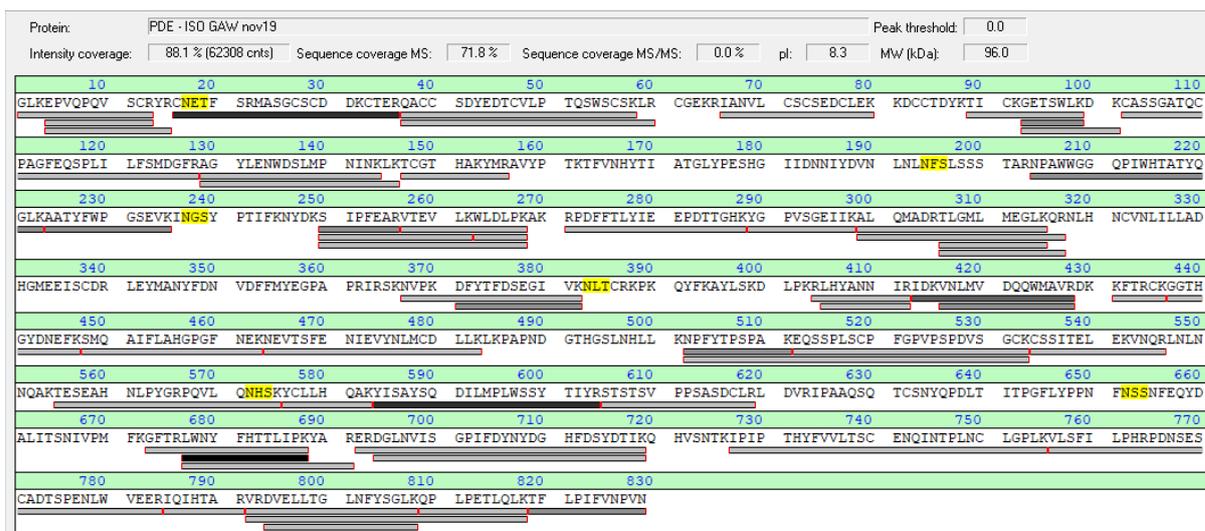


Figura 11. Cobertura da sequência da *CdcPDE* proposta em nosso estudo pelo PMF. O PMF foi analisado por MALDI-TOF e pelo software flexAnalysis 3.4 e, através do software BioTools 3.2, estes dados foram determinados. Destaque amarelo: possíveis sítios de glicosilações. Barras pretas e cinzas: peptídeos correspondentes identificados.



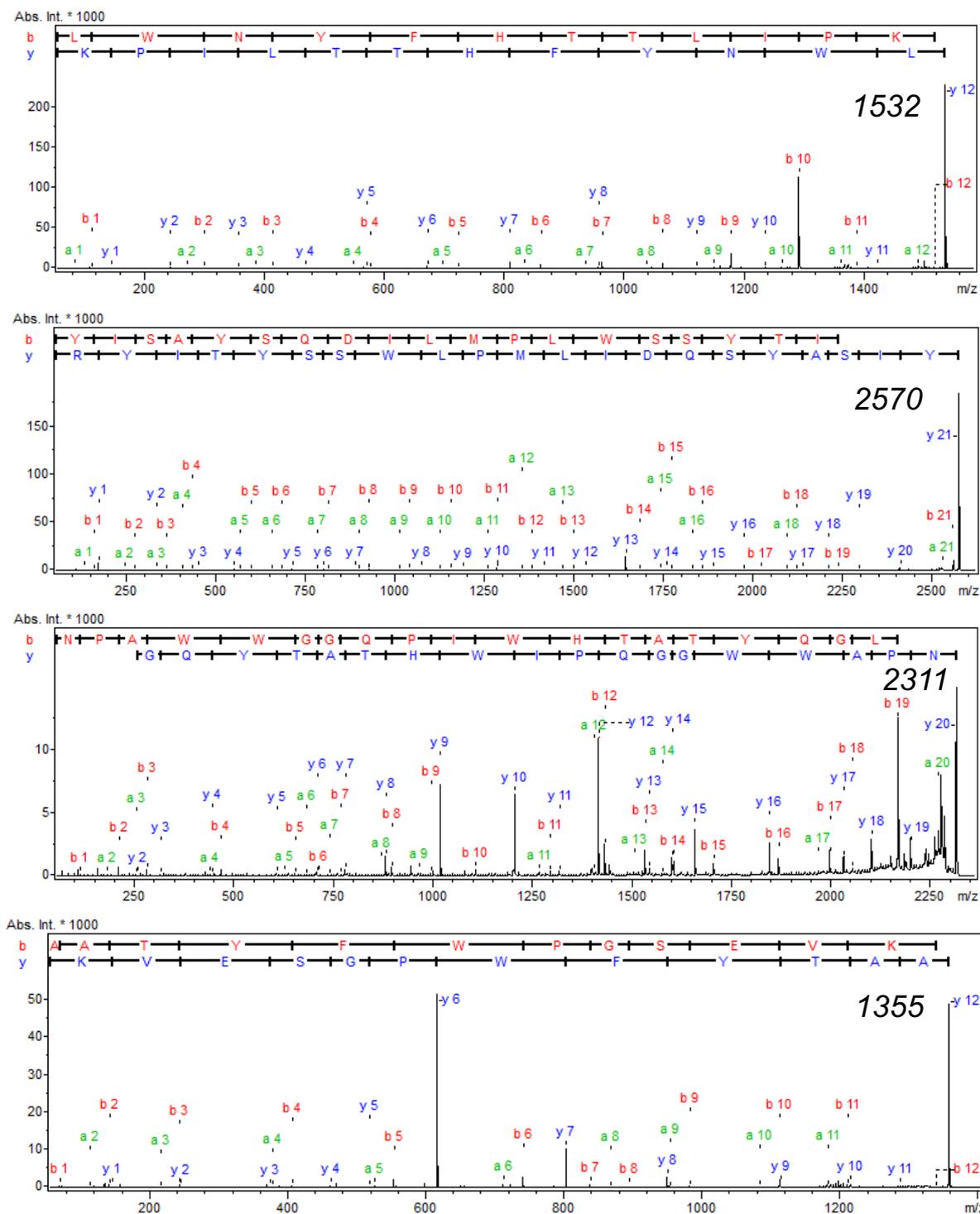


Figura 12. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 1532, 2570, 2311 e 1355.



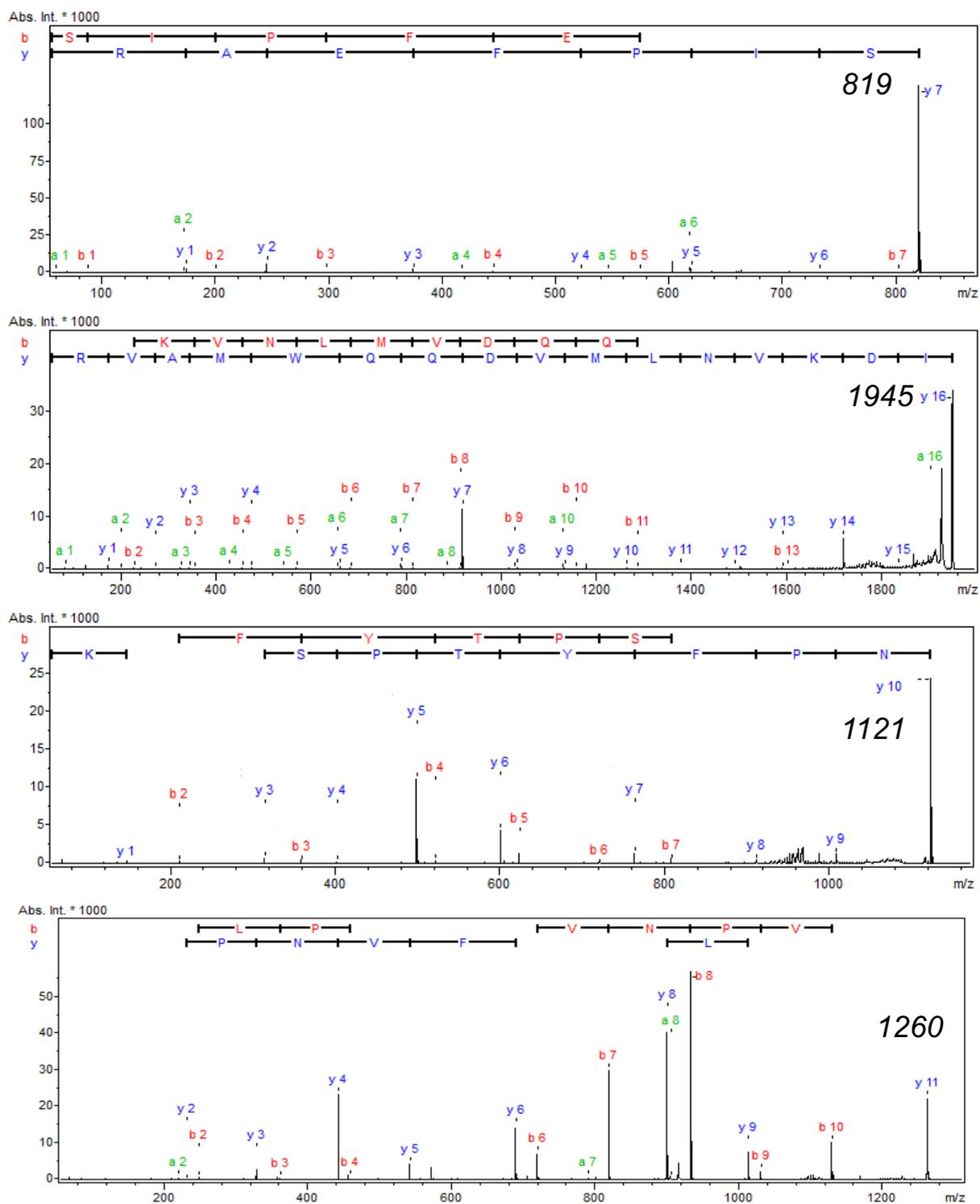


Figura 13. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 819, 1945, 1121 e 1260.



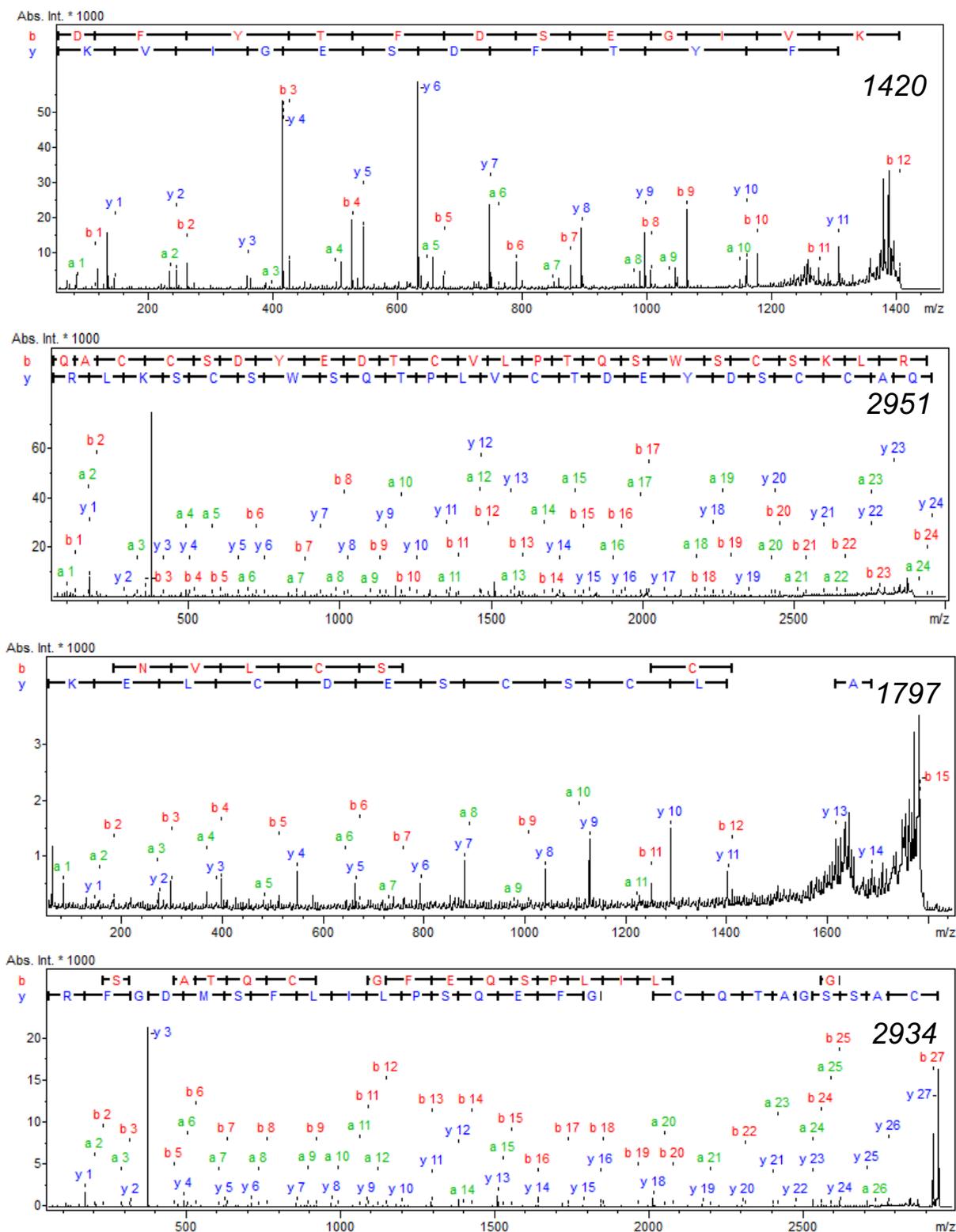


Figura 14. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 1420, 2951, 1797 e 2934.



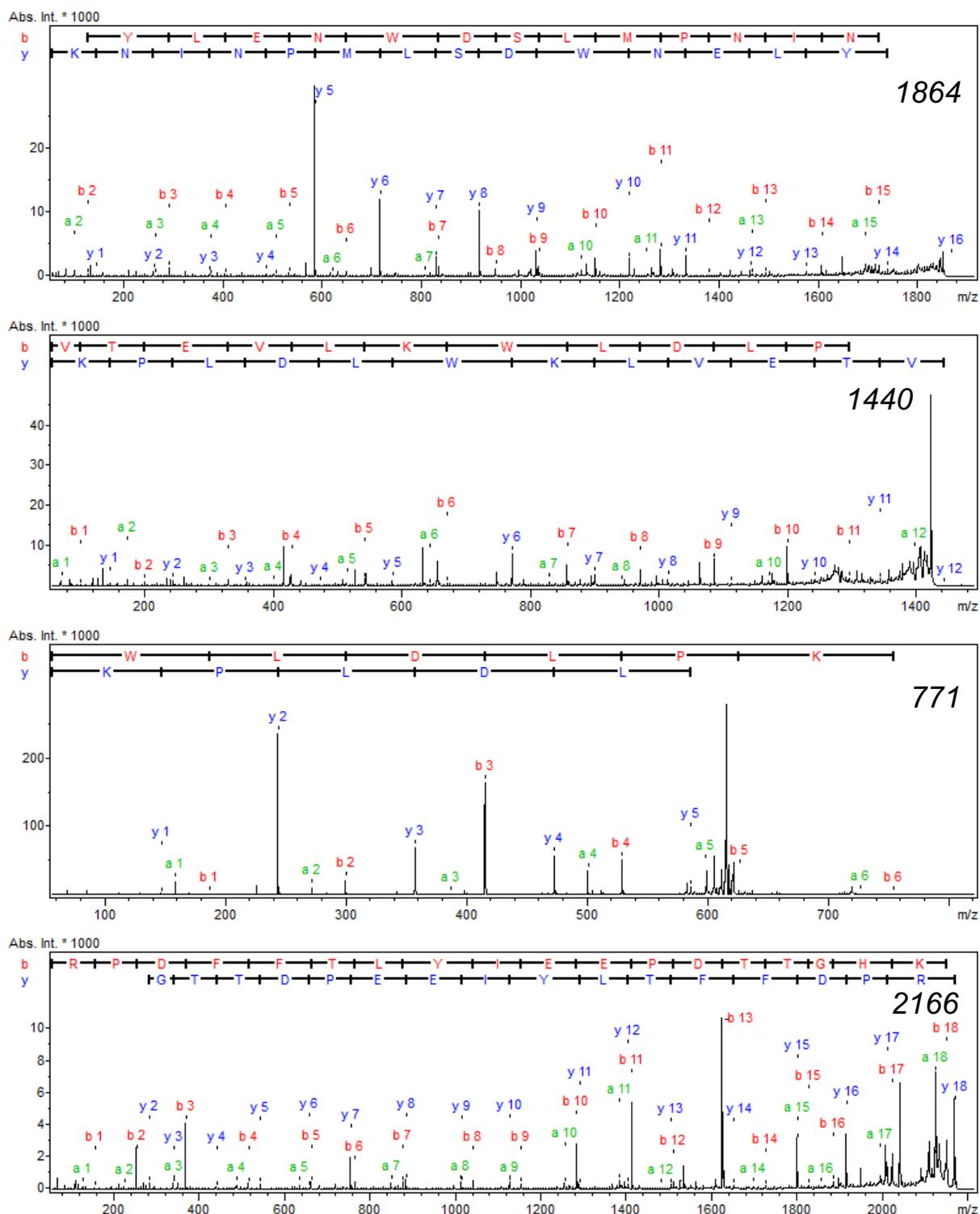


Figura 15. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 1864, 1440, 771 e 2166.



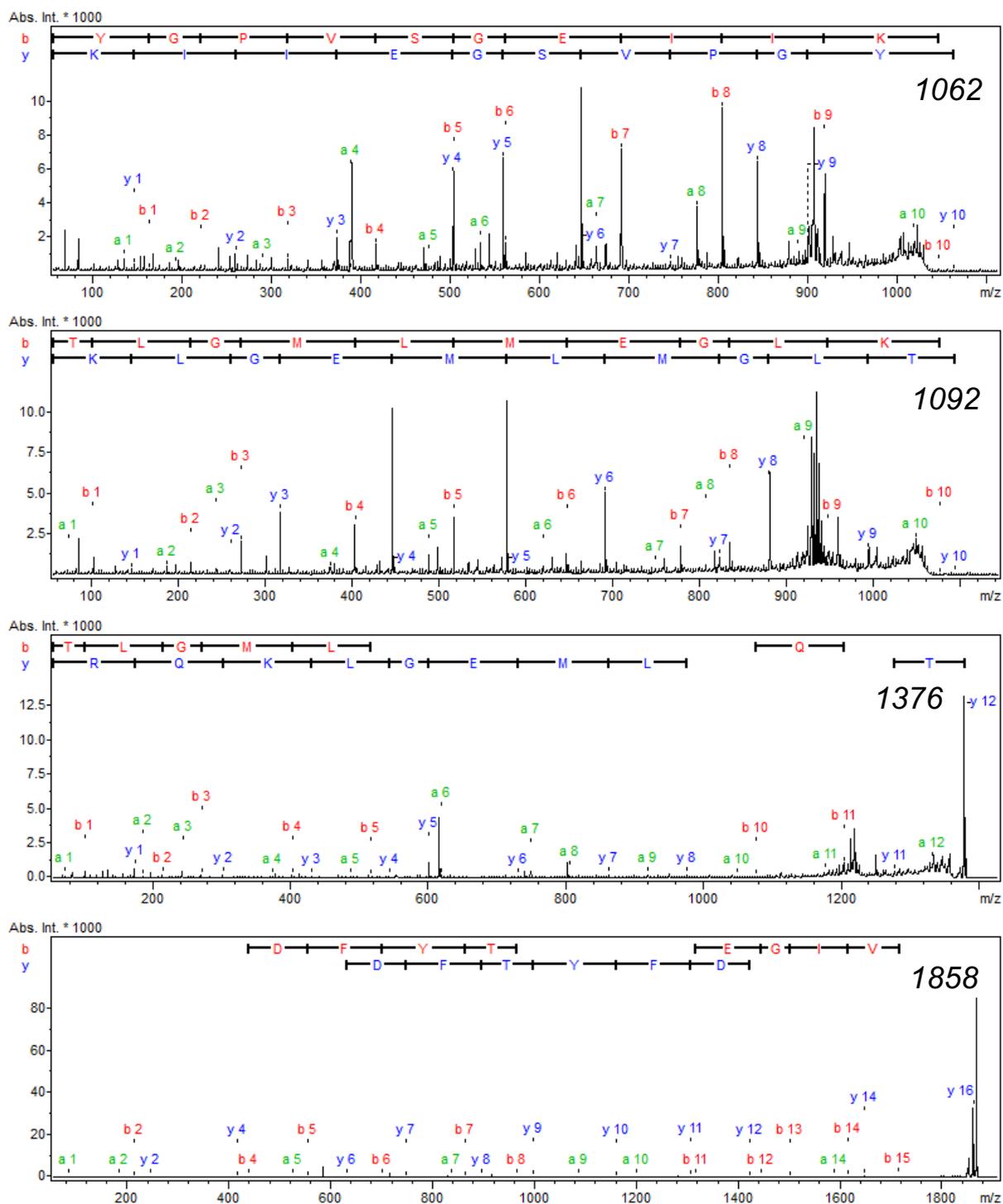


Figura 16. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 1062, 1092, 1376 e 1858.



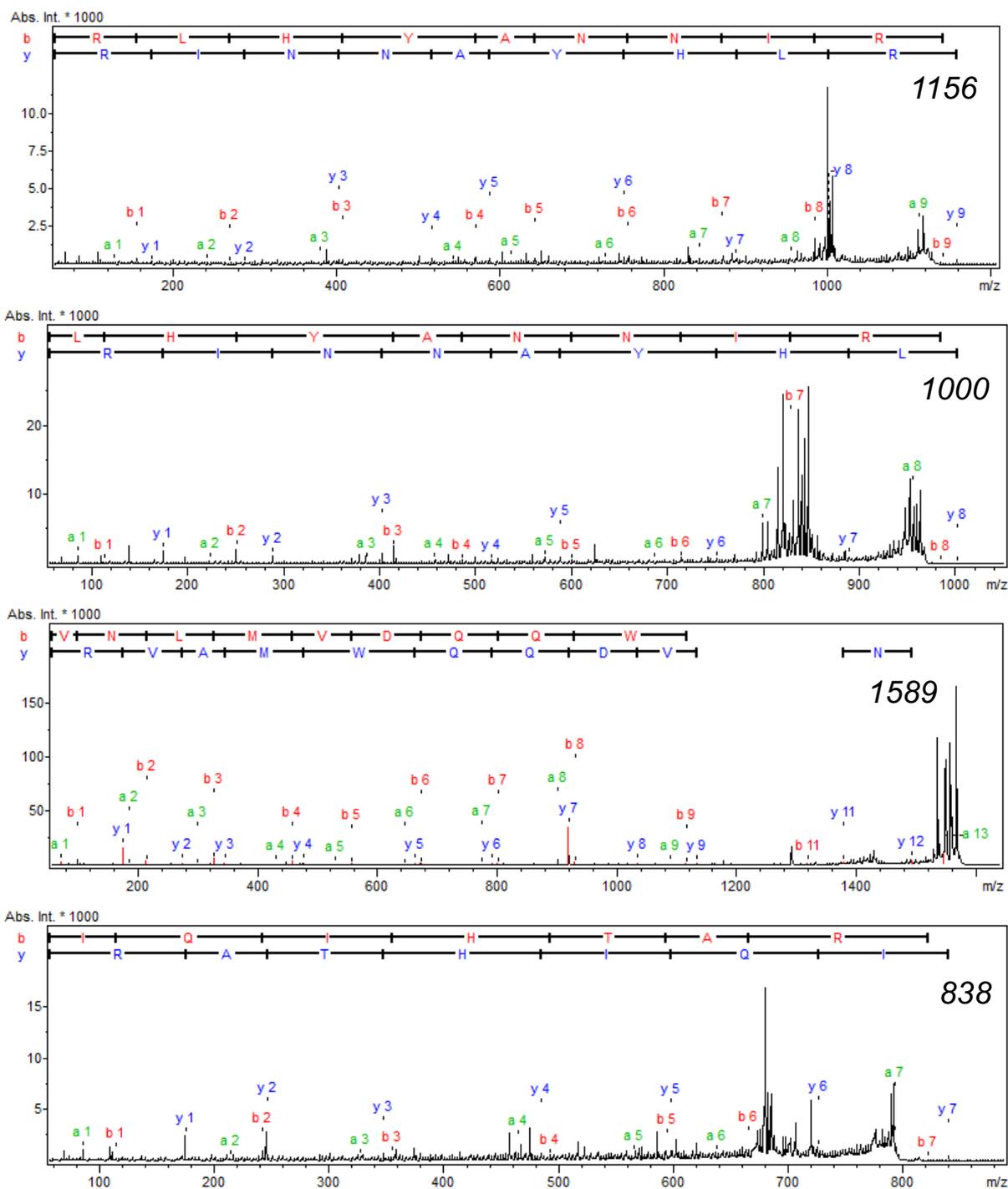


Figura 17. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 1156, 1000, 1589 e 838.



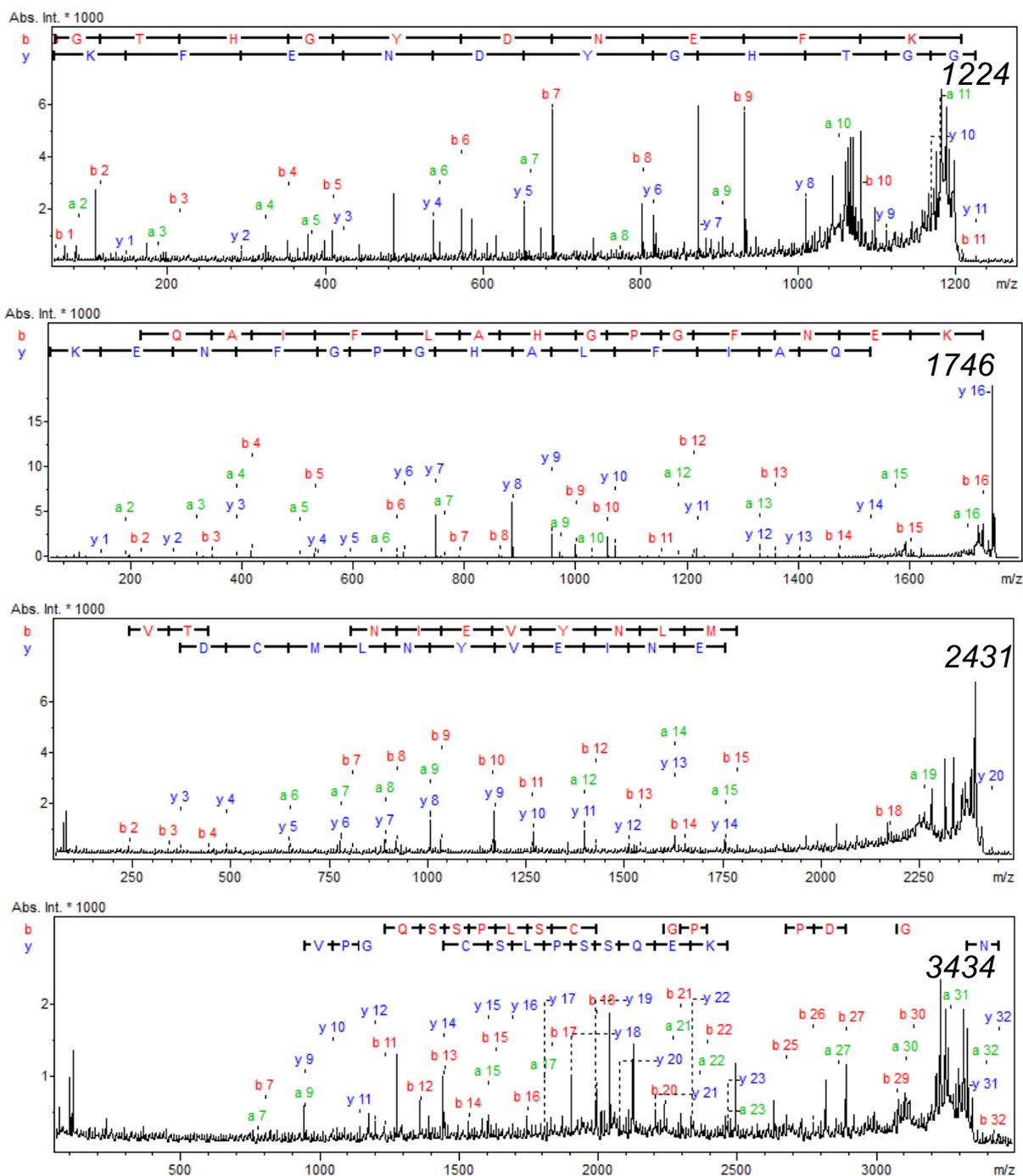


Figura 18. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 1224, 1746, 2431 e 3434.



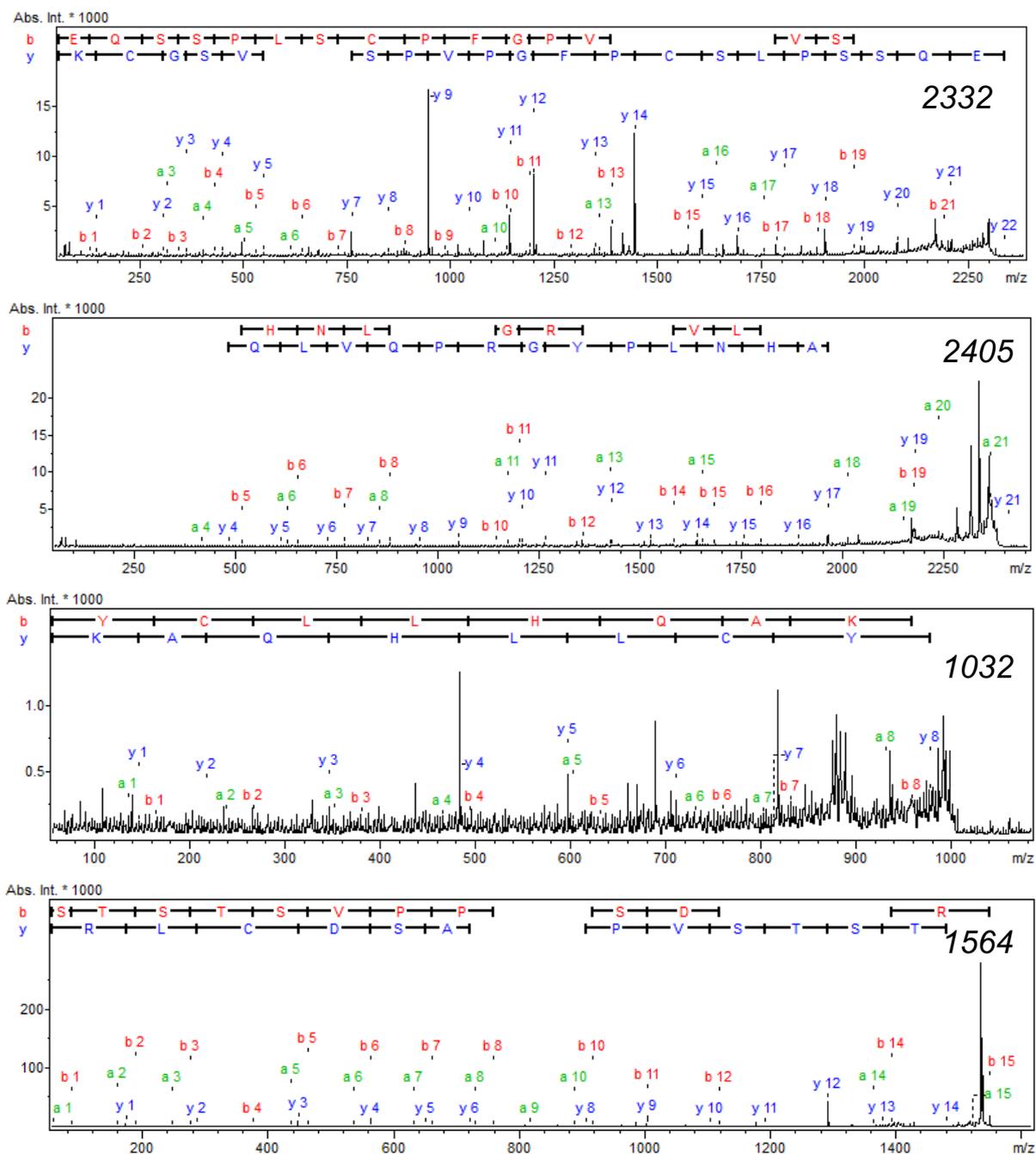


Figura 19. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 2332, 2405, 1032 e 1564.



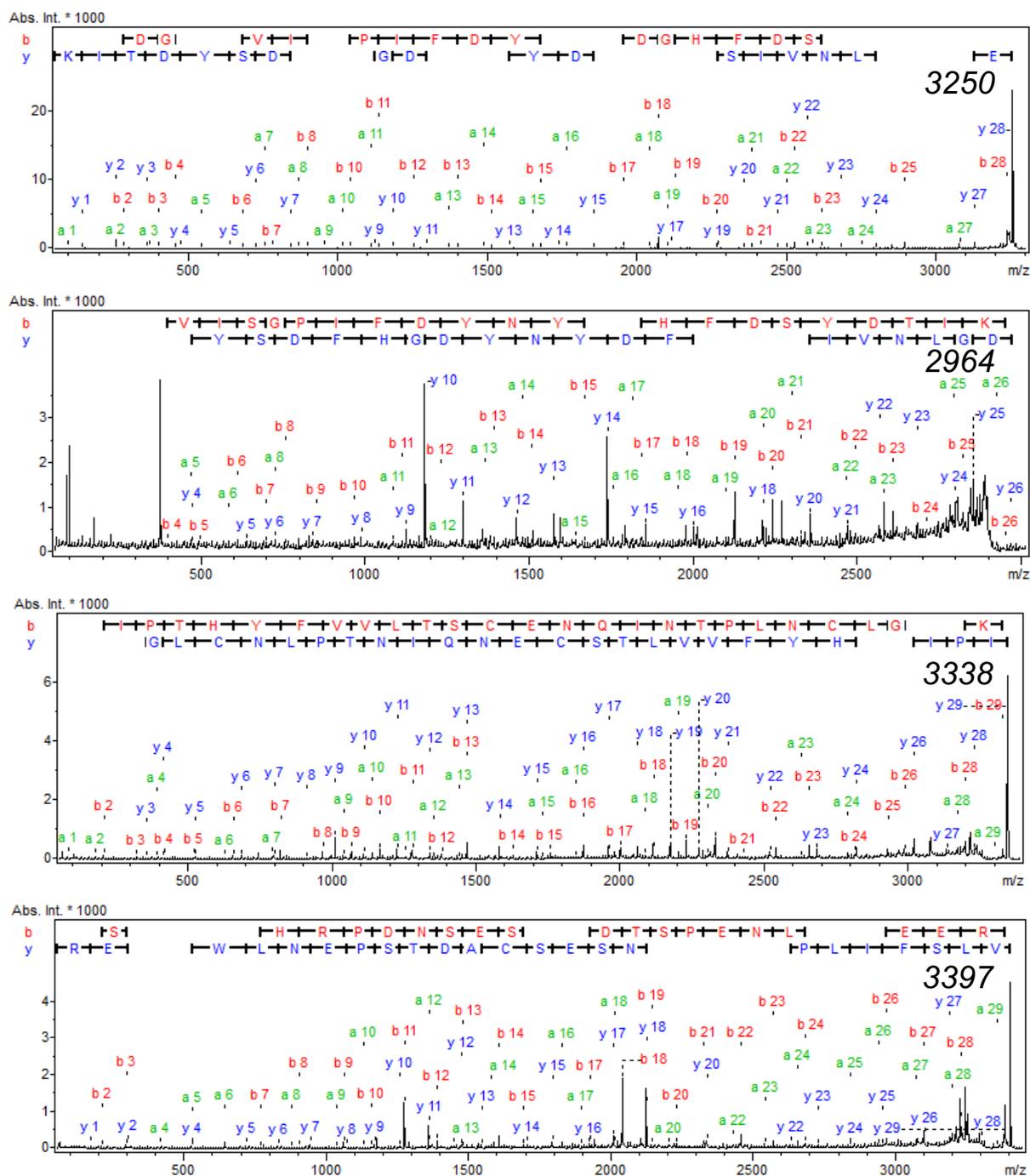


Figura 20. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 3250, 2964, 3338 e 3397.



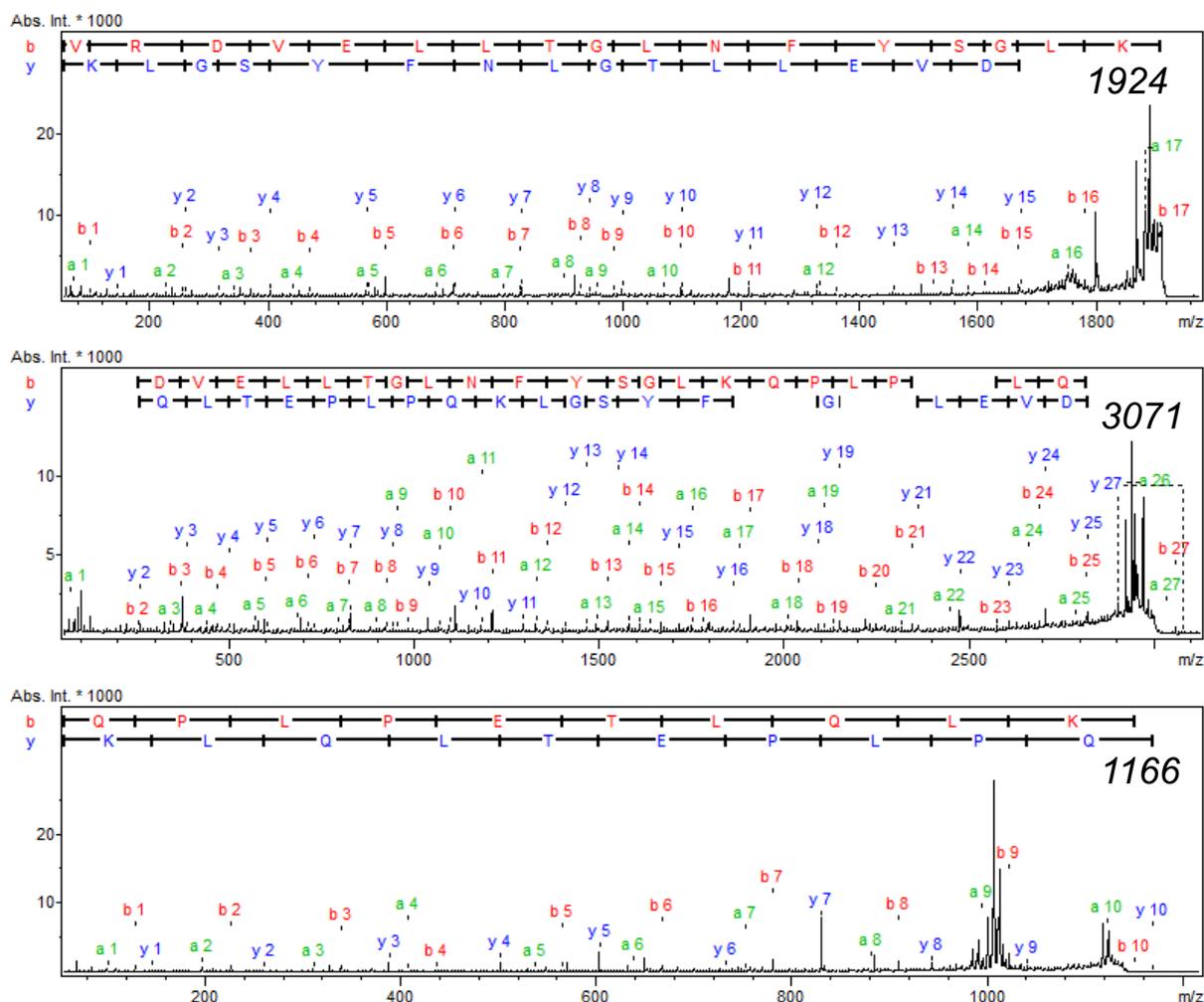


Figura 21. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos encontrados. A fragmentação dos íons foi analisada pelos softwares BioTools 3.2 e Sequence Editor 3.2, indicando os íons y (azul), b (vermelho) e a (verde). Está demonstrada a fragmentação dos íons 1924, 3071 e 1166.

A partir destes dados, foi possível fazer uma busca por similaridades entre outras seqüências de PDE já depositadas em bancos de dados, como descrito no item 3.9. Assim, foi possível observar que a *CdcPDE* obtida neste estudo apresenta alta identidade (>90%) com outras PDE oriundas de peçonhas ofídicas, tais como *C. adamanteus* (J3SEZ3.2 e J3SBP3.1), *Protobothrops flavoviridis* (T2HP62) e *Macrovipera lebetina* (W8E7D1). Suas porções C-terminais são muito similares, enquanto a porção N-terminal compartilha similaridades, mas também exibem diferenças. Além disso, são observados que todas as cisteínas são conservadas, bem como alguns sítios para glicosilações (Fig. 22), exceto em J3SBP3, a qual não apresenta um potencial sítio para glicosilação como as demais. Além disso, o sítio ativo (T) também é conservado nas demais PDE de peçonhas ofídicas.



A análise *in silico* com a sequência primária de *CdcPDE* revelou a presença de quatro domínios: (i) somatomedina B, na posição 11-48; (ii) semelhante a somatomedina B ou somatomedina B-like, na posição 52-95; (iii) ectonucleotídeo pirofosfatase/fosfodiesterase, na posição 117-483 e; (iv) DNA/RNA não-específico, na posição 581-810.

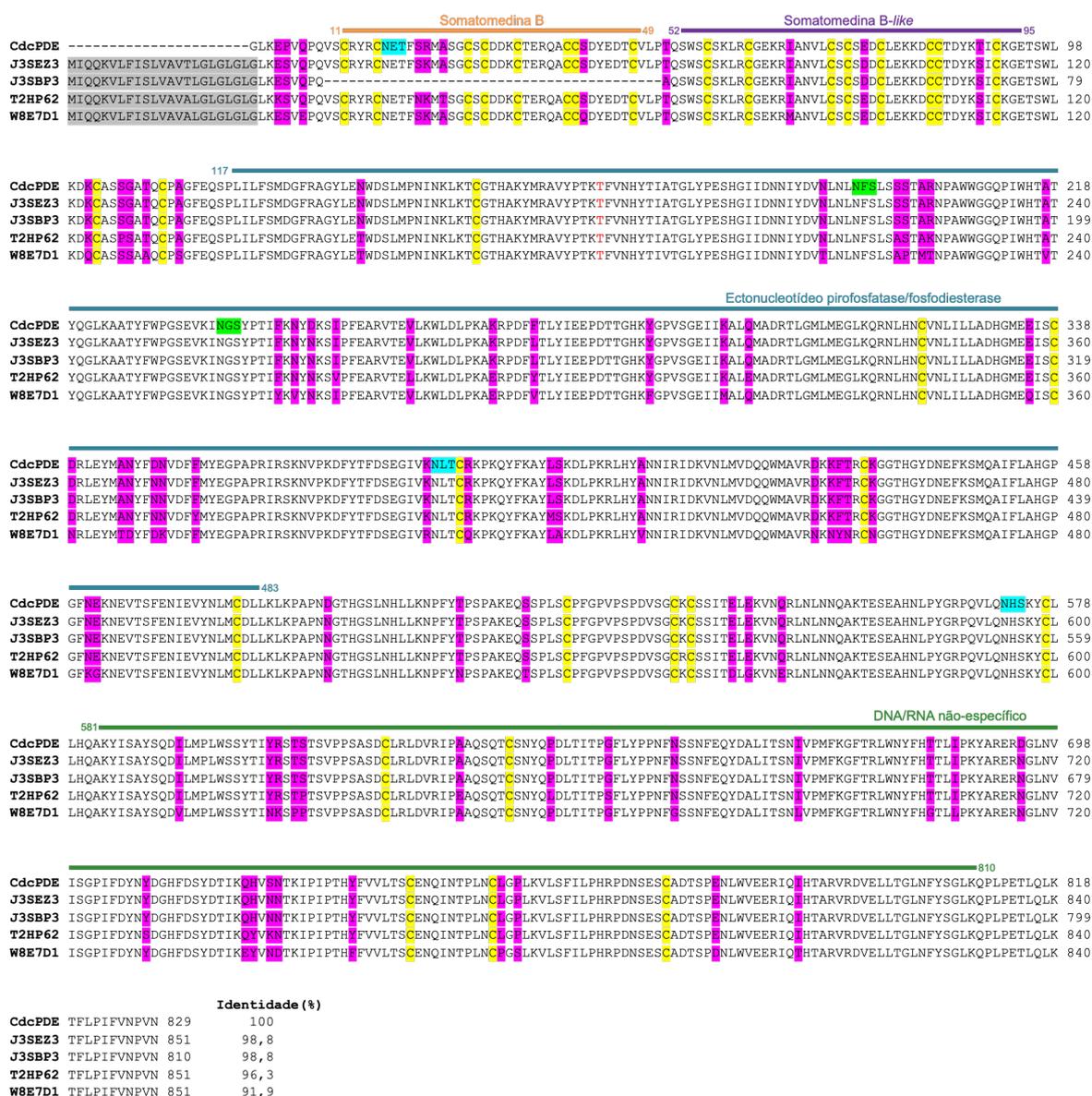


Figura 22. Alinhamento múltiplo entre sequências de *CdcPDE* e PDE de outras peçonhas ofídicas. *CdcPDE*, *C. adamanteus* (J3SEZ3 e J3SBP3), *Protobothrops flavoviridis* (T2HP62) e *Macrovipera lebetina* (W8E7D1). O alinhamento foi realizado através da ferramenta BLAST. Os resíduos conservados não apresentam destaques. Os aminoácidos com baixa similaridade estão destacados em rosa. Em cinza estão os peptídeos sinais, em amarelo estão os resíduos de cisteína. N-X-S/T destacados em azul: representam possíveis sítios preditos para N-glicosilações; N-X-S/T destacados em verde: representam sítios preditos para N-glicosilações determinados por MS/MS. Resíduo de T destacado em vermelho: possível participação no mecanismo catalítico, baseado em outras sequências de PDE.



Além disso, outro alinhamento foi realizado, mas com sequências proteicas de PDE da peçonha de *C. d. terrificus*, obtidas através do proteoma realizado em nosso laboratório (WIEZEL et al., 2018), como também descrito no item 3.9. A partir deste alinhamento, é possível observar que existem muitas diferenças entre as proteínas, mesmo que estas serpentes sejam do mesmo gênero e espécie (Fig. 23). É possível também observar que a porcentagem de identidade entre as PDE das diferentes subespécies é baixa (<50%), quando comparada às PDE de diferentes gêneros (>90%).



CdcPDE	-----GLKEPVQPQVSCRRYRNETFSRMSGCSDDKCTERQACCSYEDTCVLPQTQSWSCSKLRCG	61
CdtPDE1	-----MAKATGLRLRYQVTLGLVLMGNVACAGTAHRFRRSGEFGEEGPDSVLSDS SPWISTY SGCKNRCFELDEAEPPRCRCDNLCKSYSSCCDDFDELCLKTAGGWE CTKEH CG	109
CdtPDE2	-----MAKATGLRLRYQVTLGLVLMGNVACAGTAHRFRRSGEFGEEGPDSVLSDS SPWISTY SGCKNRCFELDEAEPPRCRCDNLCKSYSSCCDDFDELCLKTAGGWE CTKEH CG	109
CdtPDE3	MASADPAGRASRGAARTGAPKRVTLLGLVLMGNVACAGTAHRFRRSGEFGEEGPDSVLSDS SPWISTY SGCKNRCFELDEAEPPRCRCDNLCKSYSSCCDDFDELCLKTAGGWE CTKEH CG	120
CdcPDE	EKRIANVLCSCSEDCLEKKDCCTDYKTI CKGETS WLKDKCASSGATQC PAGFEQ SPLIFSMDFRAGYLENWDLSLMPNIN KLKT CGTHAKYMR AVYPTKTFV NHYTIATGLYPESHGII	181
CdtPDE1	E TRNEDHACHC SEDC LSRGDCCSNYQVV CKGDT PWVMD CCEDIRTEPC PAGFLHP PLIIFSV DGFRAS YMKKGEK VIRNIEK LRSCGTHAPYLR PVYPTKTFP NLYTLATGLYPESHGII	229
CdtPDE2	E TRNEDHACHC SEDC LSRGDCCSNYQVV CKGDT PWVMD CCEDIRTEPC PAGFLHP PLIIFSV DGFRAS YMKKGEK VIRNIEK LRSCGTHAPYLR PVYPTKTFP NLYTLATGLYPESHGII	229
CdtPDE3	E TRNEDHACHC SEDC LSRGDCCSNYQVV CKGDT PWVMD CCEDIRTEPC PAGFLHP PLIIFSV DGFRAS YMKKGEK VIRNIEK LRSCGTHAPYLR PVYPTKTFP NLYTLATGLYPESHGII	240
CdcPDE	DNNIYDVNLNLFSLSSSTARNP AWGGQPIWHTATY QGLKAA TYFW PGSEVKINGSYPTIFK NYDKS IPFEARVTEVLK WLDLPKAK RPDFF TYIEE PD TTGH KYGPVSGEIIKALQ M	301
CdtPDE1	GNSMYDPV FD AI FNL RGREK FNR WGGQPIWITAAKQGVKAGTF FWS -----NVI PYERRV LTLQWLTLADNER PYAYAF YSDQ PD MAGHRYGPF SSE MLG PLRD	331
CdtPDE2	GNSMYDPV FD AI FNL RGREK FNR WGGQPIWITAAKQGVKAGTF FWS -----NVI PYERRV LTLQWLTLADNER PYAYAF YSDQ PD MAGHRYGPF SSE MLG PLRD	331
CdtPDE3	GNSMYDPV FD AI FNL RGREK FNR WGGQPIWITAAKQGVKAGTF FWS -----NVI PYERRV LTLQWLTLADNER PYAYAF YSDQ PD MAGHRYGPF SSE MLG PLRD	342
CdcPDE	ADRTLGLMEGLKQ RNLHNCV NLILLADHGMEIISCDRLEY MANY FDNVD--FFMYEGPAPRIRSK NV PKDFYTFDSEGI VKNLT CRKPKQYFKAYLSKDL PKRLHYANN IRIDK VNLM V	420
CdtPDE1	IDKILGQLMDGLKQLNLHRCANIIFVGDHGME DVTC ERTEYLSN YLSNV DDITLIPGLGRIRAK--ANS NVK FD PKA IVANLTC KKP DQHF KPYL KQHL PKRLHYANN RRIEDIHLLVE	449
CdtPDE2	IDKILGQLMDGLKQLNLHRCANIIFVGDHGME DVTC ERTEYLSN YLSNV DDITLIPGLGRIRAK--ANS NVK FD PKA IVANLTC KKP DQHF KPYL KQHL PKRLHYANN RRIEDIHLLVE	449
CdtPDE3	IDKILGQLMDGLKQLNLHRCANIIFVGDHGME DVTC ERTEYLSN YLSNV DDITLIPGLGRIRAK--ANS NVK FD PKA IVANLTC KKP DQHF KPYL KQHL PKRLHYANN RRIEDIHLLVE	460
CdcPDE	QQWMAVR--DKK FTR CKG----GTHGYDNE EFK SMQAI FLAH GP FNE KNEVTSFENIEV YNLM CDLLK LPAP NDGTHGSLNHL LKN PFYTPSPA KE QSSPLSC PF GPVSPDV-SGCK	532
CdtPDE1	RRWHVAKRPGDVFRKITGKCYFHGDHGYDNKINS MQTV FLGYG SFKY KT VPP FENIE YNLM CDLLG LPAP NDGTHGSLNHL LRS SIYR PIMP DEIARPLH-PVATTPSSDYDLGCS	568
CdtPDE2	RRWHVAKRPGDVFRKITGKCYFHGDHGYDNKINS MQTV FLGYG SFKY KT VPP FENIE YNLM CDLLG LPAP NDGTHGSLNHL LRS SIYR PIMP DEIARPLH-PVATTPSSDYDLGCS	568
CdtPDE3	RRWHVAKRPGDVFRKITGKCYFHGDHGYDNKINS MQTV FLGYG SFKY KT VPP FENIE YNLM CDLLG LPAP NDGTHGSLNHL LRS SIYR PIMP DEIARPLH-PVATTPSSDYDLGCS	579
CdcPDE	CSSITELEKVNQRLN LNNQAK -----TESEAHNLPYGR PQVL QNH SKY CLLHQAKYISAYSQDIL MP LWSSYTIYRSTS-TSVPPSASDCLRLD VRI PAAQS	628
CdtPDE1	CD DKNRL DELSRRPYTKGTEARTYTRGEGFYTNDPEN VLP EDGCV PP PEKHL LYGR PAVLFR-TKYSLLHH HD FESGYSETFQ MP LWTSYTI SKQ VEAPGMPDQVIS CV RPDLRISPSNS	687
CdtPDE2	CD DKNRL DELSRRPYTKGTE-----EKHL LYGR PAVLFR-TKYSLLHH HD FESGYSETFQ MP LWTSYTI SKQ VEAPGMPDQVIS CV RPDLRISPSNS	659
CdtPDE3	CD DKNRL DELSRRPYTKGTEARTYTRGEGFYTNDPEN VLP EDGCV PP PEKHL LYGR PAVLFR-TKYSLLHH HD FESGYSETFQ MP LWTSYTI SKQ VEAPGMPDQVIS CV RPDLRISPSNS	698
CdcPDE	Q TCSNY Q PD LIT IP GFLYPPNFN SSN F EQY DALITSNIV PM FKG FTR LWNYFHTTLIPK YAR ERDGLN VIS GPIFDYND GH FD SYD TIKQ HVS NTKIP IP THYFV VLT SCENQINT PLN	748
CdtPDE1	Q SCTAY R VD RQMSY GFL FP QL SSSV ET KYDAFLITN VI PMYPA FKV WNYFQ RVL V KRYA IER NGV NI SG PIFDYDFD GL H DP DKI KLY VEGSSIP V PTHY YS IITSCLDFTQ PADK	807
CdtPDE2	Q SCTAY R VD RQMSY GFL FP QL SSSV ET KYDAFLITN VI PMYPA FKV WNYFQ RVL V KRYA IER NGV NI SG PIFDYDFD GL H DP DKI KLY VEGSSIP V PTHY YS IITSCLDFTQ PADK	779
CdtPDE3	Q SCTAY R VD RQMSY GFL FP QL SSSV ET KYDAFLITN VI PMYPA FKV WNYFQ RVL V KRYA IER NGV NI SG PIFDYDFD GL H DP DKI KLY VEGSSIP V PTHY YS IITSCLDFTQ PADK	818
CdcPDE	CLG PLK VL SFIL PHR PD N SES CA DT SP-ENL W VE RI QI HT AR VR D VEL L TGL N FYS GL KQ PL PET LQ LKT FL PI FV NP VN	828
CdtPDE1	CD G PL S V L AY I F PHR PD N DE S C N NS E DE S R W VE L L K M H TAR VR DI E Q L T G LD F Y R K S S R S Y SE I L S L K T Y L H T F E S E I -	887
CdtPDE2	CD G PL S V L AY I F PHR PD N DE S C N NS E DE S R W VE L L K M H TAR VR DI E Q L T G LD F Y R K S S R S Y SE I L S L K T Y L H T F E S E I -	859
CdtPDE3	CD G PL S V L AY I F PHR PD N DE S C N NS E DE S R W VE L L K M H TAR VR DI E Q L T G LD F Y R K S S R S Y SE I L S L K T Y L H T F E S E I -	898

Identidade (%)

Figura 23. Alinhamento entre as sequências de PDE de peçonhas de *C. d. collilineatus* e *C. d. terrificus*. CdcPDE e CdtPDE1-3 (PDE de *C. d. terrificus*). O alinhamento foi realizado através da ferramenta Multalin. Os resíduos conservados não apresentam destaques. Os aminoácidos diferentes estão destacados em vermelho. Em azul estão apresentados os resíduos de cisteína.



A partir destes resultados, outros fatores também podem ser inferidos:

i) Sequência: é possível que sejam duas isoformas de *CdcPDE* nesta peçonha e que sejam muito semelhantes entre si, pois não houveram divergências nos dados nos softwares utilizados, BioTools 3.2, Sequence Editor 3.2 e Peaks Studio 7, para a elaboração da presente sequência;

ii) Glicosilações: a diferença entre a massa da sequência de aminoácidos determinada (94.154 Da) e as massas obtidas por MALDI-TOF (100.329,943 Da e 105.598,170 Da), podem ser justificadas pela presença de glicosilações nas proteínas, sendo que a isoforma maior pode apresentar mais sítios glicosilados que a isoforma menor.

Glicosilações são modificações pós-traducionais de proteínas, que podem estar envolvidos na estabilidade da molécula, podem estar relacionadas a reações inflamatórias, sinalização celular, entre outras funções celulares (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012; STOWELL; JU; CUMMINGS, 2015). Entre os diferentes tipos de glicosilações, as mais estudadas e mais comuns em organismos eucariotos são as N-glicosilações. N-glicosilações ocorrem quando uma porção glicana, se liga a um resíduo de asparagina (N), através de ligação amida. Este resíduo deve fazer parte de uma tríade contendo N, qualquer aminoácido (X), exceto prolina, e uma serina ou treonina (S/T). Sendo assim, uma tríade N-X-S/T (MOREMEN; TIEMEYER; NAIRN, 2012). E foi constatado que na sequência proposta da *CdcPDE* deste estudo existem dois sítios para estas modificações (NFS e NGS, nas posições 194-196 e 237-239, respectivamente) e outros três potenciais sítios (NET, NLT, e NHS, nas posições 17-19, 383-385 e 572-574 respectivamente).

A fim de obter uma outra evidência da presença de glicosilações utilizou-se a enzima PNGase F, que é capaz de hidrolisar a ligação amida da cadeia lateral da asparagina, liberando os açúcares ligados a este resíduo (JENSEN et al., 2012) e o método SDS-PAGE, como descrito no item 3.10, com a *CdcPDE* de forma reduzida com DTT (PDE_r) e a *CdcPDE* reduzida e deglicosilada (PDE_d). Sendo assim, quando o gel foi corado com o corante *Comassie*, detectou-se a presença de ambas as formas da proteína *CdcPDE*, ao passo que, quando deglicosilada (PDE_d), a massa molecular esperada seria menor do que a proteína reduzida (Fig. 24).



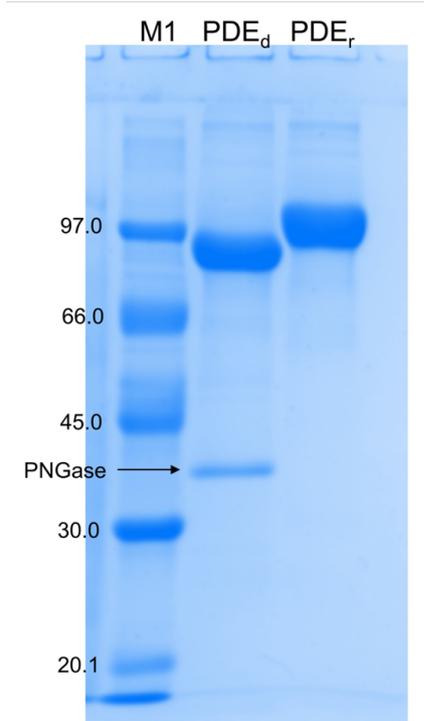


Figura 24. Perfil eletroforético da *CdcPDE* para a identificação de N-glicosilações na molécula. SDS-PAGE (10%) em condições desnaturantes. Gel corado com *Comassie Brilliant Blue G-250* (Sigma Aldrich) e descorados com água destilada; M1: marcador de baixa massa molecular (97,0 a 14,4 kDa); PDE_r: *CdcPDE* reduzida (30 µg); PDE_d: *CdcPDE* reduzida e deglicosilada (30 µg).

A partir da determinação da estrutura primária da *CdcPDE*, foi possível estimar as suas estruturas secundárias e terciárias, bem como a sua interação com o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*, como descrito no item 3.10.

Esta estimativa foi capaz de demonstrar que o modelo estrutural da *CdcPDE* apresenta 16 pontes dissulfeto, além de outras estruturas secundárias comumente conhecidas, α -hélices (22,7%), folhas β pregueadas (16,4%), 3_{10} hélices (4%), bobinas (20,2%) e giros (35,2%) (Fig. 25A-B).



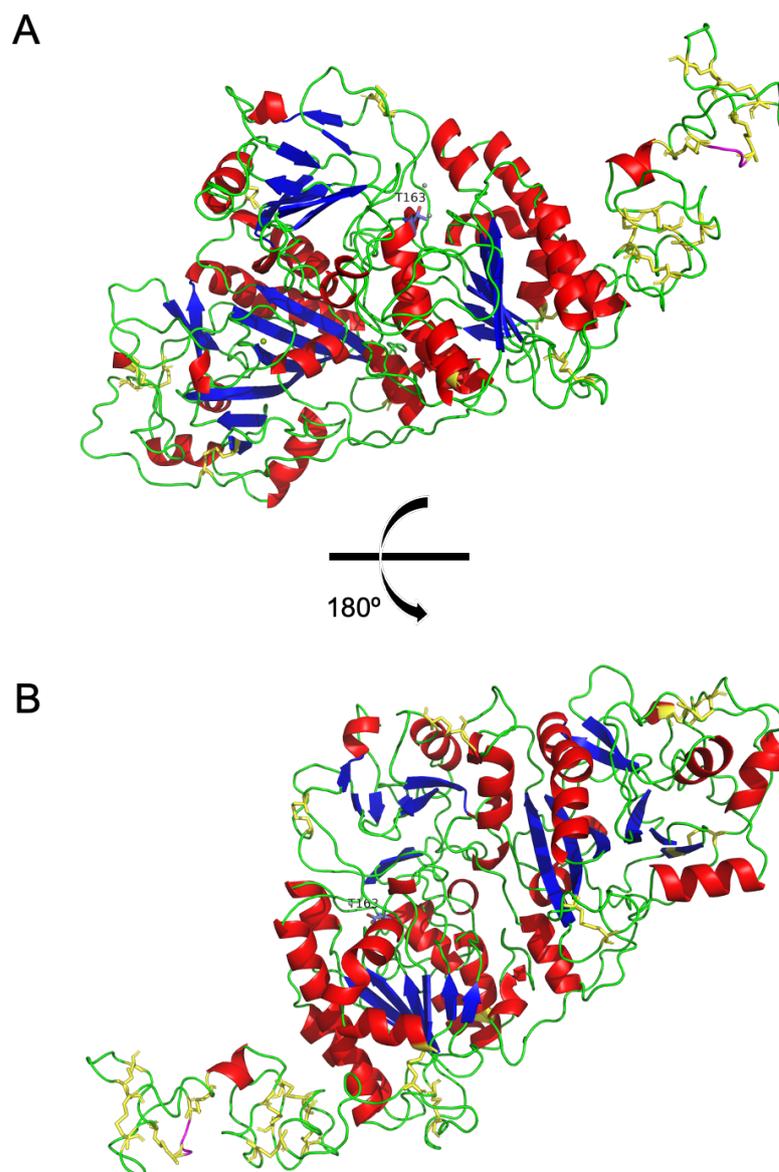


Figura 25. Modelagem molecular da CdcPDE. Visão (A) frontal e (B) posterior do modelo molecular da CdcPDE. Esta estrutura 3D foi estimada pelo software Swiss-Model, utilizando a PDE de *Naja atra* (PDB: 5GZ4) como modelo. As pontes dissulfeto estão destacadas em amarelo, α -hélices em vermelho, folhas β em azul, e o N-terminal em rosa. O resíduo T163, que pode estar envolvido na atividade enzimática de CdcPDE também está destacado.

Os valores da estimativa de qualidade do modelo global (GMQE, do inglês *Global Model Quality Estimation*) e análise de energia do modelo qualitativo (QMEAN, do inglês *Qualitative Model Energy Analysis*) foram 0,94 e -2,64, respectivamente, tornando o modelo estimado aceitável. As análises de validação mostram que >99% dos resíduos de aminoácidos estão nas regiões mais favorecidas e permitidas do gráfico de Ramachandran correspondente, e o fator de qualidade geral foi de 87,22 para o modelo estimado.



As PDE podem ser encontradas em peçonhas ofídicas de forma monomérica, homo ou heterodimérica (MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; PERRON; MACKESSY; HYSLOP, 1993; VALÉRIO et al., 2002; AL-SALEH; KHAN, 2011; FOX, 2013; TRUMMAL et al., 2014). Baseado em outra estrutura molecular de PDE já depositada em bancos de dados, foi possível modelar a *CdcPDE* de forma monomérica, enquanto o modelo proposto por Trummal e colaboradores (2014), que é de uma PDE oriunda da peçonha de *Vipera lebetina* está na forma de um heterodímero conectado por uma ligação dissulfeto (TRUMMAL et al., 2014). Entretanto, nossos resultados corroboram com o modelo proposto por Ullah e colaboradores (2019), que é de uma PDE de *C. adamanteus*, que se apresenta na forma monomérica, com 16 pontes dissulfeto (ULLAH et al., 2019).

Também realizamos o *docking* da nova molécula de *CdcPDE*, que é a simulação de encaixe entre a *CdcPDE* e o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*. A partir desta simulação foi possível observar a interação de alguns resíduos da molécula (D125, T163, H167, D283, H287, D330 e H440), a íntima relação entre o resíduo de treonina (T163) e o substrato, bem como, a necessidade de cátions divalentes para a atividade enzimática, baseado também na inibição de atividade enzimática por EDTA, que será discutido posteriormente (Fig. 26A-C).



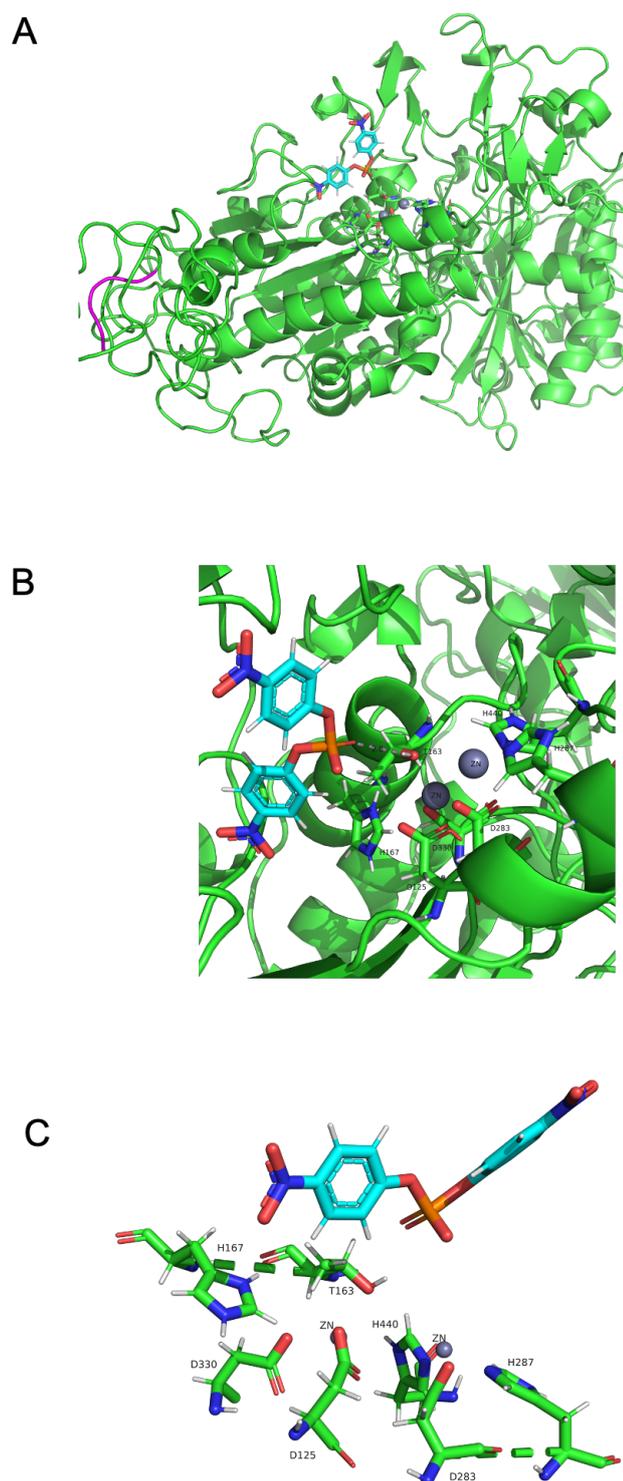


Figura 26. Simulação da interação enzima-substrato: *CdcPDE*-bis(*p*-nitrofenil)-fosfato. (A) Representação da simulação de interação, sendo o substrato bis(*p*-nitrofenil)-fosfato uma molécula representada pelas cores azul, laranja e vermelho (PubChem CID: 255). (B) Representação em aumento maior e (C) íntima interação entre partes da molécula de *CdcPDE* e o substrato.

Estes achados também foram demonstrados por Ullah e colaboradores (2019), mas também em outros estudos de PDE oriundas de peçonhas ofídicas, bem como, oriundas de



humanos (DOLAPCHIEV; VASSILEVA; KOUMANOV, 1980; MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; ZALATAN et al., 2006; ULLAH et al., 2019). Além disso, a interação da *CdcPDE* com o substrato está de acordo com o que já foi demonstrado para a PDE oriunda da peçonha de *Naja atra*, utilizando AMP como substrato (PDB ID: 5GZ5).

4.3. Atividade enzimática de *CdcPDE*

Com a *CdcPDE* previamente caracterizada estruturalmente, foi realizado o ensaio de atividade para determinar a faixa de pH em que a proteína se encontrava em sua forma mais ativa. Para isto, foi utilizada uma faixa de pH mais básica (7 a 9,5), como descrito no item 3.12, visto que as exonucleases apresentam pH ótimo básico (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010).

Como resultado, foi verificado que a *CdcPDE* apresenta maior atividade entre os pH 8 e 8,5, utilizando o substrato específico *bis(p-nitrofenil)-fosfato*, quando comparado com as demais condições de pH (Fig. 27). Assim, esta condição de pH foi utilizada para os demais ensaios enzimáticos.

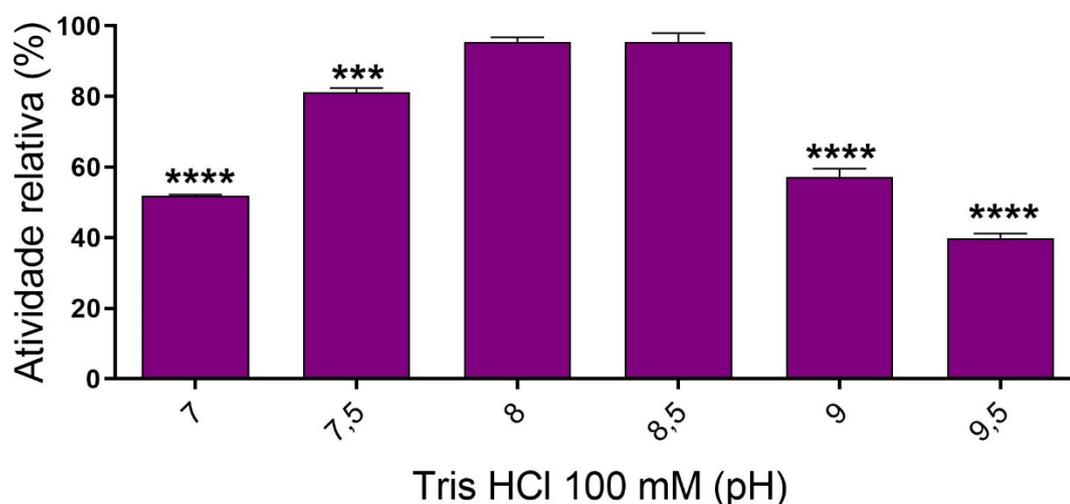


Figura 27. Influência de diferentes pH na atividade da *CdcPDE*. O ensaio de atividade enzimática foi realizado através da adição de substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (1 mM) à mistura de enzima *CdcPDE* (0,75 µg) e tampão Tris-HCl 100 mM com pH distintos previamente incubada por 5 minutos, a 37 °C. Após 15 minutos, a 37 °C, a reação foi interrompida com a adição de NaOH 50 mM e a leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, repetidos três vezes e os valores estão correspondem a média ± erro padrão médio (EPM). Como controle negativo, a mesma quantidade de *CdcPDE* foi inativada por aquecimento (100 °C), por 10 minutos, e utilizada nas mesmas condições do ensaio. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao pH que a *CdcPDE* mostrou maior atividade enzimática (pH 8).

Nossos resultados corroboram com o fato das exonucleases apresentarem pH ótimo básico, entretanto algumas enzimas podem ter pH ótimos mais básicos que outras. Por exemplo,



a PDE de *B. alternatus* apresenta melhor atividade entre os pH 7,5 e 9,5 (VALÉRIO et al., 2002), enquanto a PDE de *V. lebetina* apresenta melhor atividade em pH 8,8 (TRUMMAL et al., 2014). Já a PDE de *A. bilineatus* apresenta melhor atividade entre os pH 9 e 11 (AL-SALEH; KHAN; ASHRAF, 2009), condição esta que não seria favorável para a *CdcPDE*, visto que houve decréscimo de sua atividade enzimática em condições de pH maiores que 8,5.

Embora a atividade da enzima possa variar em relação à basicidade dos tampões, constata-se nestes trabalhos citados que em condições ácidas, e também no presente estudo em pH menores que 8, a PDE apresenta pouca atividade enzimática.

Em relação a influência de temperatura na atividade enzimática da *CdcPDE*, dois ensaios diferentes foram realizados, a atividade enzimática foi realizada em diferentes temperaturas (0 a 50 °C), enquanto no outro, a *CdcPDE* foi previamente incubada em diferentes temperaturas (-80 a 70 °C), como descrito no item 3.13.

Como resultado do primeiro ensaio, foi observado que a *CdcPDE* apresenta maior atividade a 37 °C (Fig. 28). Já no segundo ensaio, nota-se que, quando armazenada a 0 °C, a *CdcPDE* apresentou maior atividade (Fig. 29).

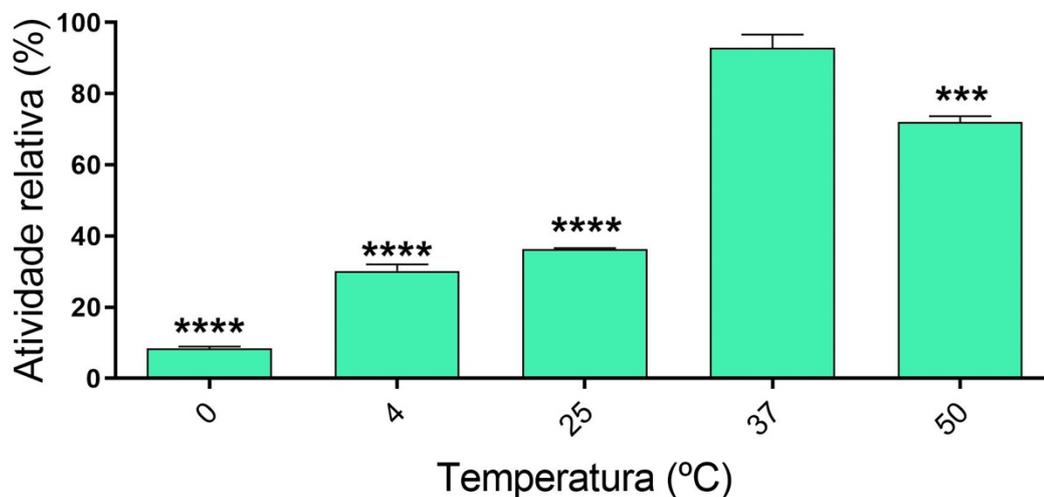


Figura 28. Influência de diferentes temperaturas na atividade da *CdcPDE*. O ensaio de atividade enzimática foi realizado através da adição de substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (1 mM) à mistura de enzima *CdcPDE* (0,75 µg) e tampão Tris-HCl 100 mM pH 8 previamente incubada por 5 minutos em temperaturas distintas (0 a 50 °C). Após 15 minutos de incubação nestas temperaturas, a reação foi interrompida com a adição de NaOH 50 mM e a leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, repetidos três vezes e os valores correspondem à média ± erro padrão da média (EPM). Como controle negativo, a mesma quantidade de *CdcPDE* foi inativada por aquecimento (100 °C), por 10 minutos, e utilizada nas mesmas condições do ensaio. *** $p < 0,01$ e **** $p < 0,0001$ quando comparado a temperatura que a *CdcPDE* mostrou maior atividade enzimática (37 °C).



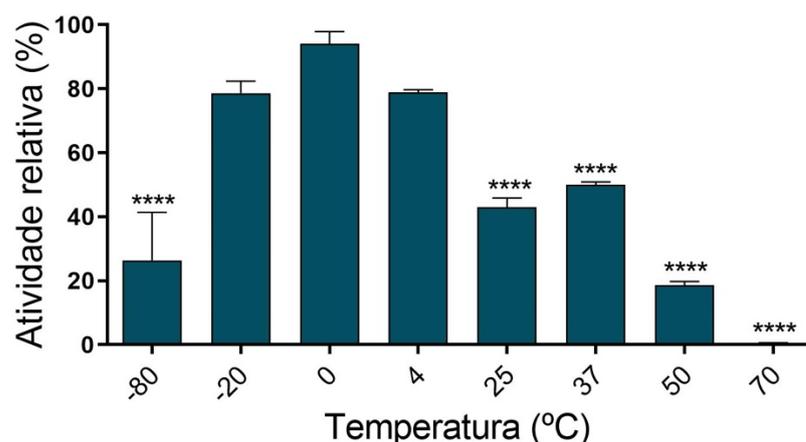


Figura 29. Influência de diferentes temperaturas de armazenamento na atividade da *CdcPDE*. Inicialmente, *CdcPDE* (0,75 µg) foi incubada em diferentes temperaturas (-80 a 70 °C) por 1 hora. Em seguida, estas amostras foram dispersas em tampão Tris-HCl 100 mM, pH 8, por 5 minutos, a 37 °C. Após este período, o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (1 mM) foi adicionado à mistura e após 15 minutos de incubação a 37 °C, a reação foi interrompida com a adição de NaOH 50 mM e a leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm. O ensaio foi realizado em triplicata, repetidos três vezes e os valores estão correspondem a média ± erro padrão médio (EPM). Como controle negativo, a mesma quantidade de *CdcPDE* foi inativada por aquecimento (100 °C), por 10 minutos, e utilizada nas mesmas condições do ensaio. **** $p < 0,0001$ quando comparado a temperatura que a *CdcPDE* mostrou maior atividade enzimática (0 °C).

Estudos prévios mostram que a temperatura ótima para as PDE varia entre 55 e 60 °C, sendo que elas perdem atividade em temperaturas maiores que 65 e 70 °C (BJÖRK, 1963; PHILIPPS, 1975, 1976; SUGIHARA et al., 1986; HALIM et al., 1987; MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; VALÉRIO et al., 2002). No presente estudo, constatou-se que a *CdcPDE* apresenta atividade enzimática em torno de 72% a 50 °C, quando comparado ao ensaio realizado a 37 °C, o que indica uma diminuição da atividade em temperaturas maiores.

A atividade enzimática de *CdcPDE* também foi testada frente a diferentes concentrações de inibidores, como descrito no item 3.14. A partir deste ensaio, foi demonstrado que a atividade enzimática de *CdcPDE* é inibida de forma dose-dependente por β-mercaptoetanol, enquanto os demais inibidores (cisteína, DTT e EDTA) inibiram completamente a atividade enzimática de *CdcPDE* em todas as concentrações testadas (Tab. 5).

Tabela 5. Porcentagem de atividade de *CdcPDE* na presença de diferentes concentrações de inibidores enzimáticos.

Inibidor	<i>CdcPDE</i> + inibidor (%)*					
	0	0,625	1,25	2,5	5	10
β-mercaptoetanol	95 ± 6	71 ± 2	56 ± 3	41 ± 2	24 ± 1	7 ± 4
Cisteína	93 ± 8	0,4 ± 0,5	0,2 ± 0,3	0 ± 0	0 ± 0	0 ± 0
DTT	95 ± 6	0,5 ± 0,4	0 ± 0	0,2 ± 0,3	0,4 ± 0,8	0,5 ± 0,5
EDTA	93 ± 8	0,2 ± 0,3	0 ± 0	0,7 ± 0,6	0 ± 0	0,5 ± 0,8

**CdcPDE* e diferentes inibidores (0,625-10 mM) foram previamente incubados por 30 mins., a 37 °C. Como controle positivo (sem inibidor), *CdcPDE* foi incubada apenas com tampão (Tris-HCl 100 mM, pH 8).



Esta inibição de forma dose-dependente por β -mercaptoetanol também já foi observada em outras PDE oriundas de peçonhas ofídicas, como em *B. alternatus* (VALÉRIO et al., 2002) e *C. cerastes* (HALIM et al., 1987). Já a inibição de *CdcPDE* por outros agentes redutores, como a cisteína e o DTT, sugerem que as pontes dissulfeto existentes em sua estrutura sejam essenciais para a atividade enzimática, como foi demonstrado em PDE oriundas da peçonha de *N. nigricollis* (IBRAHIM; SALAMA; HAKIM, 2016).

Além disso, no presente estudo também foi observada a inibição de *CdcPDE* por EDTA, que é amplamente conhecido como quelante metálico, indicando que a *CdcPDE* é uma metaloenzima, sendo os íons metálicos essenciais também para a atividade enzimática. O mesmo também acontece com PDE de *C. adamanteus*, que apresenta íons cálcio, magnésio e zinco em sua estrutura (DOLAPCHIEV; VASSILEVA; KOUMANOV, 1980), PDE de *T. stejnegeri*, que apresenta cobre e zinco em sua estrutura (PENG et al., 2011), e PDE de *D. russelli*, que apresenta apenas zinco em sua estrutura (MITRA; BHATTACHARYYA, 2014).

Os ensaios para a determinação dos parâmetros cinéticos enzimáticos foram realizados nas condições em que a *CdcPDE* apresentou maiores atividades enzimáticas, sobre o substrato específico *bis(p-nitrofenil)-fosfato*, como descrito no item 3.15. Para este ensaio foram utilizadas 15 concentrações diferentes de substrato (0,017-5 mM) e as curvas de formação do produto estão apresentadas na figura 30.

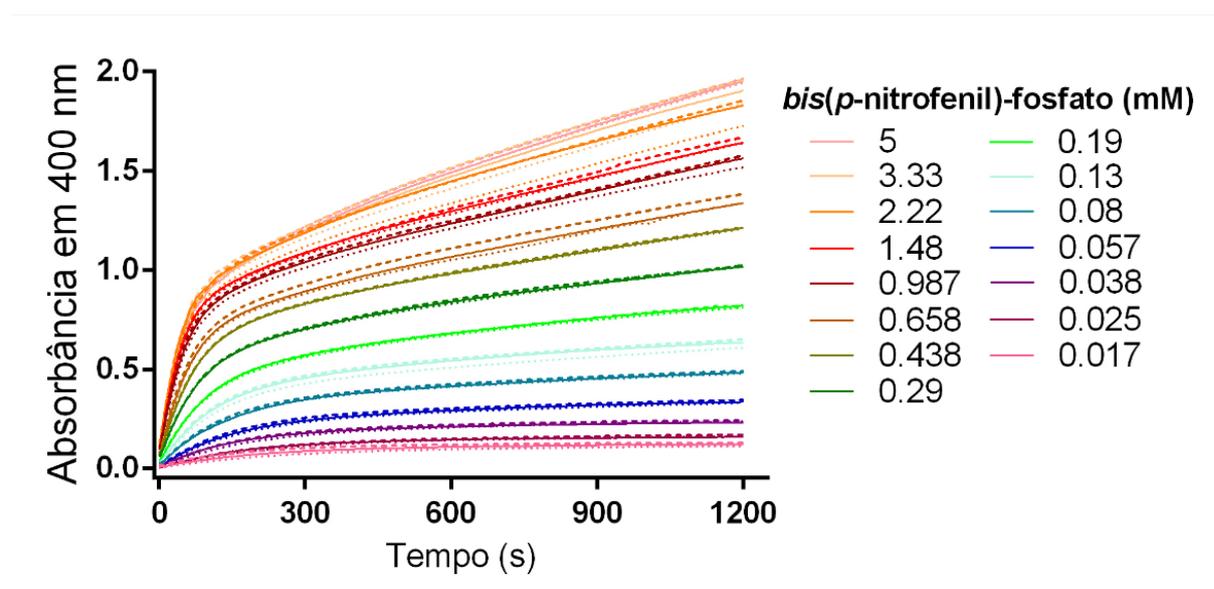


Figura 30. Curva cinética de formação do produto pela *CdcPDE*. Curva cinética de formação de produto pela *CdcPDE* (5 μ g) versus tempo de reação. Ensaio realizado em triplicata e a 37 °C. As linhas pontilhadas e tracejadas da mesma cor indicam as replicatas de cada concentração.



O substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* em solução é hidrolisado em *p-nitrofenol* e *p-nitrofenil fosfato*, de coloração amarela, que apresenta absorvância em 400 nm. Desta forma, durante a incubação, quanto maior for a hidrólise do substrato pela enzima, maior será a absorvância observada no ensaio.

Após todas as incubações de enzima-substrato, o intervalo de 0 a 60 segundos, foi escolhido para a determinação dos parâmetros cinéticos, visto que a formação do produto apresentava caráter linear, de forma que a concentração do substrato não alterava a velocidade enzimática (NELSON; COX, 2014b). Este intervalo foi então utilizado para determinar a inclinação da reta de cada concentração de substrato, sendo necessária para os cálculos de velocidade inicial (V_0), a qual é utilizada para a determinação dos parâmetros cinéticos.

A atividade enzimática da *CdcPDE* segue o modelo cinético de Michaelis-Menten, exibindo uma curva de caráter hiperbólico, de V_0 versus concentração de substrato (Fig. 31).

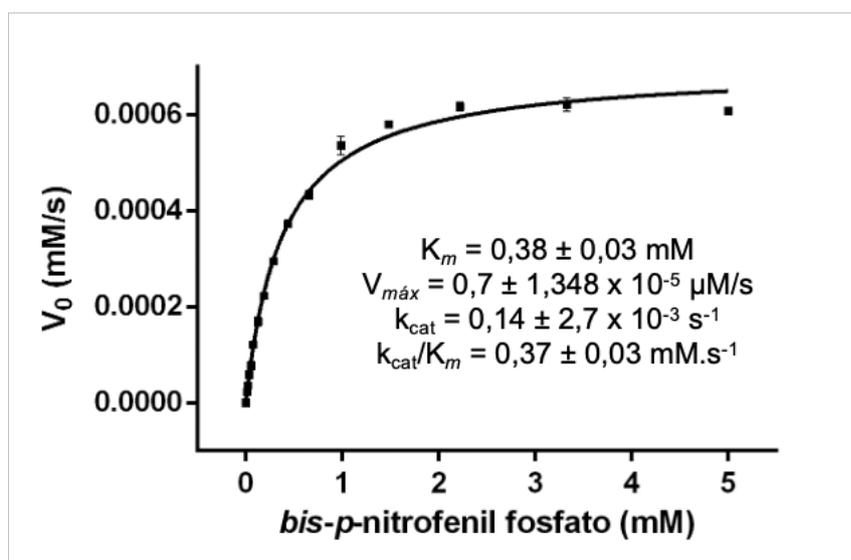


Figura 31. Cinética enzimática de Michaelis-Menten da *CdcPDE*. Cinética enzimática da *CdcPDE* (5 μ g) diante de diferentes concentrações de substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato* (0,017-5 mM). Ensaio realizado em triplicata e a 37 °C.

Após os cálculos determinados pelo software GraphPad Prism 6, foi observado que o valor de K_m é de $0,38 \pm 0,03$ mM, $V_{m\acute{a}x}$ é $0,7 \pm 1,348 \times 10^{-5}$ μ M/s e k_{cat} é $0,14 \pm 2,7 \times 10^{-3}$ s^{-1} , enquanto o valor de eficiência catalítica é de $0,37 \pm 0,03$ $mM \cdot s^{-1}$.

O valor de K_m da *CdcPDE* é menor que de outras PDE oriundas de peçonhas ofídicas, quando se utiliza o mesmo substrato, como de *B. jararaca* (21,88 mM) (SANTORO et al., 2009), *B. alternatus* (2,69 mM) (VALÉRIO et al., 2002) e *C. cerastes* (4,33 mM) (HALIM et al., 1987), mas também bem próximo ao valor de K_m da PDE isolada de *D. russelli* (0,308 mM)



(MITRA; BHATTACHARYYA, 2014). Este baixo valor de K_m mostra que, tanto a *CdcPDE* quanto a PDE de *D. russelli*, possuem de 7 a 57 vezes mais afinidade por este substrato (*bis(p-nitrofenil)-fosfato*) do que as outras PDE descritas.

Em relação aos valores de k_{cat} , o da *CdcPDE* é maior do que o valor de k_{cat} da PDE de *B. jararaca* ($4,4 \times 10^{-4} \text{ s}^{-1}$) (SANTORO et al., 2009). Enquanto o valor da eficiência catalítica da PDE de *B. jararaca* é de $2 \times 10^{-5} \text{ mM.s}^{-1}$, indicando uma maior eficiência cinética da *CdcPDE*. Porém, como o pH do tampão de reação não é semelhante (pH 8,9), as diferenças observadas nas constantes catalíticas podem estar relacionadas aos diferentes ambientes físico-químicos.

4.4. Estabilidade da *CdcPDE*

Estudos anteriores mostram a redução em mais de 25% da atividade fosfodiesterásica quando liofilizada (BJÖRK, 1963). Nossos dados corroboram com estes estudos, assim, outra alternativa seria secar estas amostras em centrifuga rotatória a vácuo, como descrito no item 3.16. Entretanto, os resultados obtidos através do ensaio de atividade enzimática demonstram que, mesmo seca e não liofilizada, a fração S3, que contém a *CdcPDE*, teve sua atividade enzimática reduzida (Fig. 32).

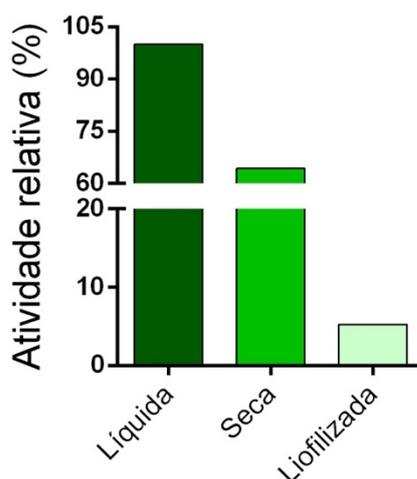


Figura 32. Atividade da fosfodiesterase após processos de eliminação de água das amostras. A fração S3, oriunda de cromatografia de filtração molecular (50 μL), foi seca ou liofilizada. Após tais processos, as frações foram dispersas em água deionizada e adicionadas a mistura de substrato e tampão. Após 15 minutos, a 37 $^{\circ}\text{C}$, a reação foi interrompida com a adição de NaOH 50 mM. A leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm. Como controle positivo, a mesma fração não foi submetida a processos de perda de água (líquida).



Visto que a atividade enzimática da *CdcPDE* foi reduzida em ambos os processos de eliminação da água, a alternativa para a redução de volume da amostra foi o processo de concentração das frações de interesse em tubo Amicon em centrífuga, como descrito no item 3.2. A membrana do tubo utilizado é capaz de reter componentes maiores que 50 kDa e, portanto, esta metodologia permite a redução do volume destas frações, mantendo a *CdcPDE*, em virtude de que sua massa molecular esperada está entre 90 e 160 kDa (MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; PERRON; MACKESSY; HYSLOP, 1993; VALÉRIO et al., 2002; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010; AL-SALEH; KHAN, 2011; FOX, 2013; TRUMMAL et al., 2014).

Em relação ao processo de purificação da *CdcPDE*, outro fato também deve ser ressaltado, a perda de atividade enzimática em soluções contendo TFA. Soluções de TFA em diversas concentrações são utilizadas em processos cromatográficos em colunas de fase reversa para garantir uma melhor resolução da separação de proteínas, entretanto, constatou-se a perda de atividade enzimática da *CdcPDE* na amostra inicial. Desta forma, foi avaliada a atividade enzimática da amostra em diferentes concentrações de TFA (0,01 a 0,1%), como descrito no item 3.17. Como resultado, todas as amostras que foram ressuspendidas em qualquer concentração de TFA, perderam a atividade enzimática (Fig. 33). Por esta razão, a cromatografia de fase reversa foi realizada apenas a avaliação de pureza da *CdcPDE* e para os ensaios de caracterização estrutural da enzima, pois nenhum destes ensaios necessitam de atividade enzimática preservada para que sejam realizados.

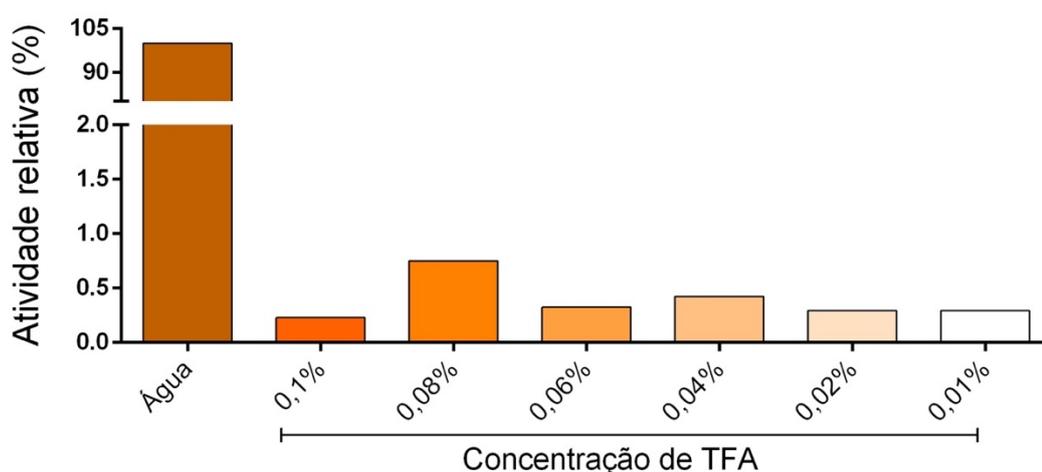


Figura 33. Atividade da fosfodiesterase em diferentes concentrações de TFA. A fração S3 (50 μ L) foi incubada TFA em diferentes concentrações (0,01 a 0,1%) e adicionada à mistura de substrato e tampão. Após 15 minutos, a 37 $^{\circ}$ C, a reação foi interrompida com a adição de NaOH 50 mM. A leitura da absorbância foi realizada sob comprimento de onda de 400 nm. Como controle positivo, a mesma fração foi incubada com água.



Também foi avaliada a estabilidade térmica da *CdcPDE* em diferentes condições de pH e salinidade, utilizando diferentes tampões e concentrações de NaCl, através da técnica do *Thermofluor*TM, como descrito no item 3.18. Esta técnica é amplamente utilizada na busca de ligantes proteicos e também, para a varredura de condições que desestabilizam proteínas, pois é capaz de monitorar seu desenovelamento, de acordo com a temperatura, utilizando corante fluorescente em ambientes apolares, no caso, em sítios hidrofóbicos das proteínas desenoveladas (POKLAR et al., 1997; PANTOLIANO et al., 2001; CUMMINGS; FARNUM; NELEN, 2006; NIESEN; BERGLUND; VEDADI, 2007; BOIVIN; KOZAK; MEIJERS, 2013).

A T_m da *CdcPDE* é 65,71 °C e, nas condições testadas, foi observado que, em ácido succínico 50 mM, pH 5,5, sem NaCl, foi obtida a melhor estabilidade, aumentando a temperatura de desenovelamento da PDE em 4,1 °C. Também, neste pH, mas nas concentrações de 50 e 100 mM de NaCl, observou-se aumento na temperatura de desenovelamento de 3,7 °C para ambas as condições, sendo estas as três melhores condições de estabilidade da *CdcPDE*. Em apenas uma condição não observamos aumento da temperatura de desenovelamento, que foi o caso da enzima em tampão glicina 50 mM, pH 9,5 e NaCl 150 mM.

Além disso, em outras condições foi observado uma menor resistência da *CdcPDE*. Quando se encontra em pH 4,5, a *CdcPDE* se desenovela em menores temperaturas, dependendo da concentração de NaCl.

Todos estes resultados estão apresentados na figura 34.



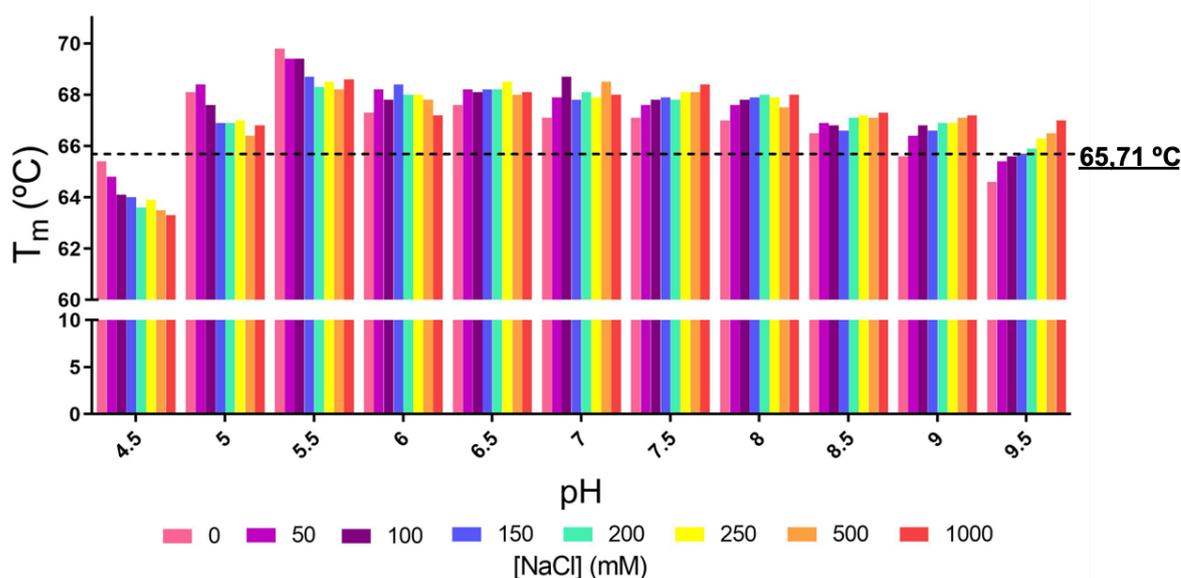


Figura 34. Estabilidade térmica da *CdcPDE*. A *CdcPDE* (2 μ g) foi incubada com água e diferentes condições com tampões a 50 mM (CH_3COONa pH 4,5; citrato de sódio pH 5; ácido succínico pH 5,5; MES pH 6; *bis*-Tris pH 6,5; imidazol pH 7; HEPES pH 7,5; Tris pH 8; *bis*-Tris propano pH 8,5; AMPD pH 9; e glicina pH 9,5), contendo diferentes concentrações de NaCl (0-1000 mM). O corante fluorescente *Sypro Orange* (50X) foi adicionado às amostras. A desnaturação térmica foi avaliada nas temperaturas entre 25 a 95 $^{\circ}\text{C}$, com aumentos graduais de 1 $^{\circ}\text{C}/\text{min}$, seguido de leitura da fluorescência em 492/610 nm em termociclador em tempo real Mx3005P.

Estes resultados podem sugerir que a perda de atividade de outras PDE de peçonhas ofídicas em temperaturas superiores a 65 $^{\circ}\text{C}$ está relacionada ao seu possível desenovelamento devido ao aumento de temperatura.

4.5. Ensaios imunológicos

O ensaio de reconhecimento antigênico da *CdcPDE* pelo soro anticrotálico comercial (Instituto Butantan) foi realizado através do método de ELISA. O objetivo deste ensaio foi verificar se a enzima é reconhecida e neutralizada pelos anticorpos presentes no soro anticrotálico durante o tratamento de quadros de envenenamento por serpentes do gênero *Crotalus* no Brasil. Esta técnica vem sendo utilizada desde a década de 1970, por ser simples, barata, específica, rápida e pode ser também utilizada para detectar toxinas, peçonhas ofídicas, bem como para avaliar a potência de soros antiofídicos (THEAKSTON; LLOYD-JONES; REID, 1977; BARBOSA et al., 1995; SELVANAYAGAM; GOPALAKRISHNAKONE, 1999).

A *CdcPDE*, bem como a peçonha de *C. d. collilineatus*, foram incubadas com o soro anticrotálico comercial, como descrito no item 3.19, para avaliar a capacidade do soro em



reconhecer estas amostras. Os resultados mostram que o soro anticrotálico foi capaz de reconhecer significativamente, tanto a peçonha, quanto a *CdcPDE* (Fig. 35). Verifica-se também que não há a ocorrência de resultados falsos positivos, visto que o soro de um cavalo não imunizado comercial não reconheceu a *CdcPDE* e a peçonha de forma inespecífica, o que foi usado como controle negativo neste ensaio, C(-) SV e C(-) PDE.

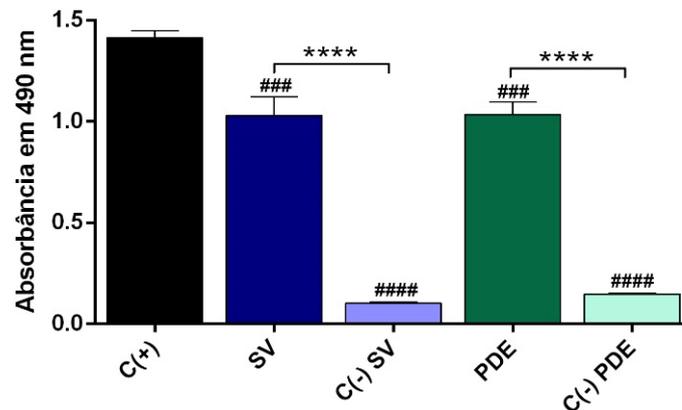


Figura 35. Reconhecimento da *CdcPDE* pelo soro anticrotálico comercial através do método de ELISA. A *CdcPDE* e a peçonha de *C. d. collilineatus* (2 µg) foram incubadas com soro anticrotálico comercial, a fim de avaliar a capacidade do soro em reconhecê-las (método de ELISA). C(+): poços sensibilizados com soro de cavalo não-imunizado diluído (2:100); SV: peçonha de *C. d. collilineatus* incubada com soro anticrotálico comercial diluído (1:100); C(-) SV: peçonha de *C. d. collilineatus* incubada com soro de cavalo não-imunizado diluído (1:100); PDE: *CdcPDE* incubada com soro anticrotálico comercial diluído (1:100); C(-) PDE: *CdcPDE* incubada com soro de cavalo não-imunizado diluído (1:100). **** $p < 0,0001$ quando comparado ao seu devido controle negativo (C(-)); ### $p < 0,01$ quando comparado ao controle positivo (C(+)); #### $p < 0,0001$ quando comparado ao controle positivo (C(+)).

Este resultado não foi surpreendente, uma vez que a previsão de epítomos *in silico*, como descrito no item 3.20, mostrou que existem 16 possíveis epítomos na enzima, que podem ser reconhecidos por células B do sistema imunológico, desencadeando a resposta imune humoral mediada por anticorpos (Fig. 36).



GLKEPVQPOVSCRYRCNE TFSRMASGCSCDDKCTERQACCS DYEDTCVLPQTQSWSCSKLRCGEEKRIANVL
 CSCSEDCLEKKDCCT DYKTICKGETSWLKDKCASSGATQC PAGFEQSPLILF SMDGFRAGYLENWDLSMP
 NINKLKTCTGTHAKYMRAYPTKTFVNHYTIATGLYPE SHGIIDNNIYDVNLNLFSLSSSTARNPAWGG
 QPIWHTATYQGLKAATYFWPGSEVKINGSYPTIFKNYDKSIPFEARVTEVLKWL DLPKAKRPDFFTLYIE
 EPD TTGHKYGPVSGEIKALQ MADRT LGMLMEGLKQRNLHNCVNLI LLADHGMEEISC DRLEYMANYFDN
 VDFMYEGP APRIRSKNVPKDFYTF DSEGI VKNLTCRKPQYFKAYLSKDL PKRLHYANNIRIDKVNLMV
 DQQWMAVRDKKFTRCKGGTHGYDNEFKSMQAI FLAHGPGFNEKNEVTSFENIEVYNLMCDLLKLPAPND
 GTHGSLNHLLKNPFYTPSPAKEQSSPLSCPFGPVPSPDVSGCKCSSITELEKVNQRLNLNQAKTESEAH
 NLPYGRPQVLQNH SKYCLLHQAKYISAYSQDILMPLWSSYTIYRSTSTSVPPSASDCLRLDVRI PAAQSQ
 TCSNYQPDLTITPGFLYPPNFNSSFNEQYDALITSNIVPMFKGFTRLWNYFH TTLIPKYARERDGLNVIS
 GP IFDYNYDGHFDSYDTI KQHVSN TKIPIPTHYFVVL TSCENQINTPLNCLGPLKVL SFILPHRPDENSES
 CADTSPENLWVEERI QIHTARVRDVELLTGLNFYSGLKQPLPETLQLKTF LPIFVNPNV

Figura 36. Predição de epítomos a serem reconhecidos pelo soro antiofídico. A predição de epítomos da *CdcPDE* que podem ser reconhecidos pelo soro antiofídico foi realizada através da ferramenta ABCpred Server, com limiar de 0,9, contendo entre 14 a 16 resíduos de aminoácidos. Os epítomos preditos estão destacados em verde na estrutura primária de *CdcPDE*.

Para o tratamento específico de envenenamentos ofídicos, a administração de antivenenos é a única medida realmente eficaz (LAUSTSEN et al., 2018; WHO, 2019), sendo assim, é importante que este reconheça também PDE oriundas de serpentes. Apesar de estar presente em pequenas proporções nas peçonhas ofídicas (FOX, 2013; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2017), a *CdcPDE* é um dos componentes do *pool* de peçonhas que são inoculadas em cavalos para a produção de soro. Ainda, devido a sua alta massa molar, não é surpreendente que esta proteína seja imunogênica para o sistema imune de cavalos. Existem estudos demonstrando que o tamanho ideal de epítomos imunogênicos que induzem uma resposta imunológica efetora está entre 10 e 20 resíduos de aminoácidos (BREMEL; HOMAN, 2010; SIVALINGAM; SHEPHERD, 2012). Desta forma, nossa predição corrobora com este fato, revelando epítomos com tamanhos dentro desta faixa de resíduos de aminoácidos.

4.6. Ensaio de agregação plaquetária

A fim de avaliar a atividade da *CdcPDE*, um ensaio de agregação plaquetária foi realizado, como descrito no item 3.21. Neste ensaio foi utilizado o PRP e como agonista de agregação, o ADP. Como resultado, pode ser observado que a *CdcPDE* leva a inibição da agregação destas plaquetas, de forma dose-dependente, de forma que, uma maior concentração de *CdcPDE*, leva a uma maior porcentagem de inibição, e assim sucessivamente (Fig. 37). Este efeito pode ser devido a hidrólise da molécula de ADP, visto que as PDE são capazes de realizar esta ação (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010). Assim, nossos resultados corroboram com



dados já descritos na literatura, que demonstram que PDE oriundas das peçonhas de *B. jararaca*, *D. russelli* e *T. stejnegeri* são capazes de levar a inibição da agregação de plaquetas quando induzidas por ADP (SANTORO et al., 2009; PENG et al., 2011; MITRA; BHATTACHARYYA, 2014).

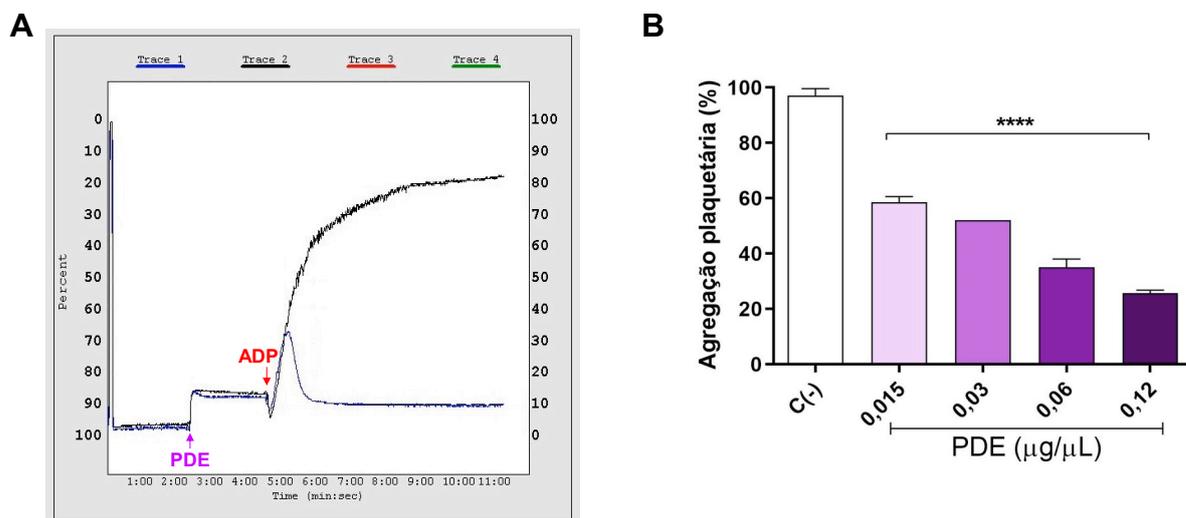


Figura 37. Inibição da agregação de plaquetas induzidas por ADP pela *CdcPDE*. Diferentes concentrações de *CdcPDE* (50 µL) foram incubadas com PRP (450 µL) a 37 °C por 5 minutos sob agitação. Após este período, foi adicionado ADP (2,4 µM) à mistura e a agregação foi monitorada por 6 minutos. **(A)** Perfil representativo do ensaio de agregação plaquetária, em que as plaquetas incubadas com PDE estão apresentadas em azul e plaquetas incubadas com água estão apresentadas em preto. **(B)** Porcentagem de inibição da agregação plaquetária pelas diferentes concentrações de PDE. C(-): água. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo.

4.7. Ensaio de citotoxicidade em queratinócitos humanos

Até o momento, não existem relatos de que as PDE oriundas de peçonhas ofídicas são citotóxicas. Assim, foi realizada uma avaliação para verificarmos se *CdcPDE* era ou não citotóxica para queratinócitos humanos imortalizados (células N/TERT), como descrito no item 3.22.

Nossos resultados demonstram que a *CdcPDE* é citotóxica para queratinócitos humanos em concentrações maiores que 10 µg/mL, apresentando valor de IC_{50} de 71,65 µg/mL (Fig. 38A-B). Existem muitos estudos que avaliaram a citotoxicidade de toxinas animais *in vitro*, mas sempre utilizando outras linhagens celulares (GASANOV et al., 1997; PUCCA et al., 2015; OLIVEIRA et al., 2018). A avaliação da citotoxicidade de toxinas em queratinócitos humanos não é rotineira, sendo poucas vezes realizada (AHMADI et al., 2020; PUCCA et al., 2020). Entretanto, durante o envenenamento ofídico, as células da pele são diretamente afetadas (LAING et al., 2003; RIVEL et al., 2016), sendo que estes estudos deveriam ser levados em



consideração com mais frequência. Desta forma, nosso estudo é pioneiro em mostrar que as PDE são tóxicas para células da pele.

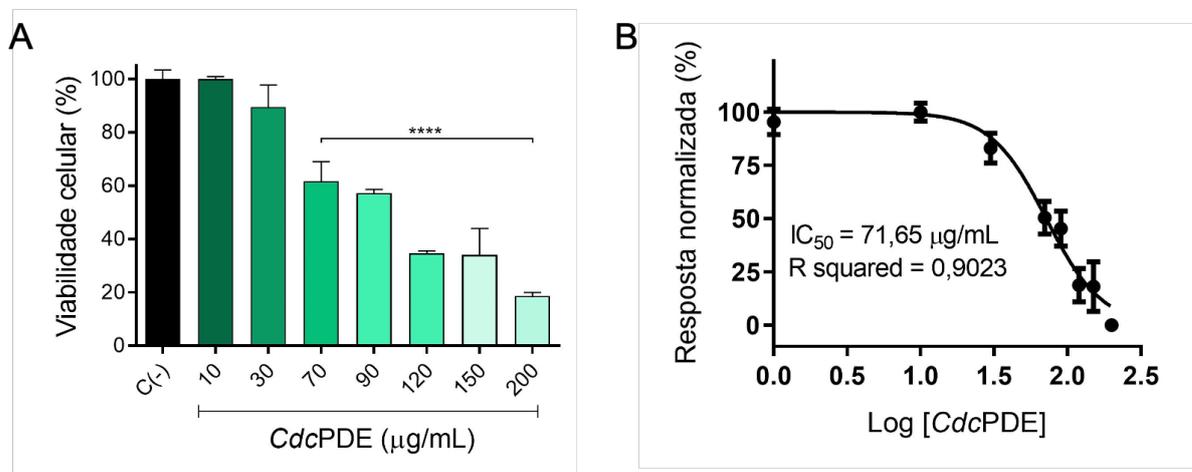
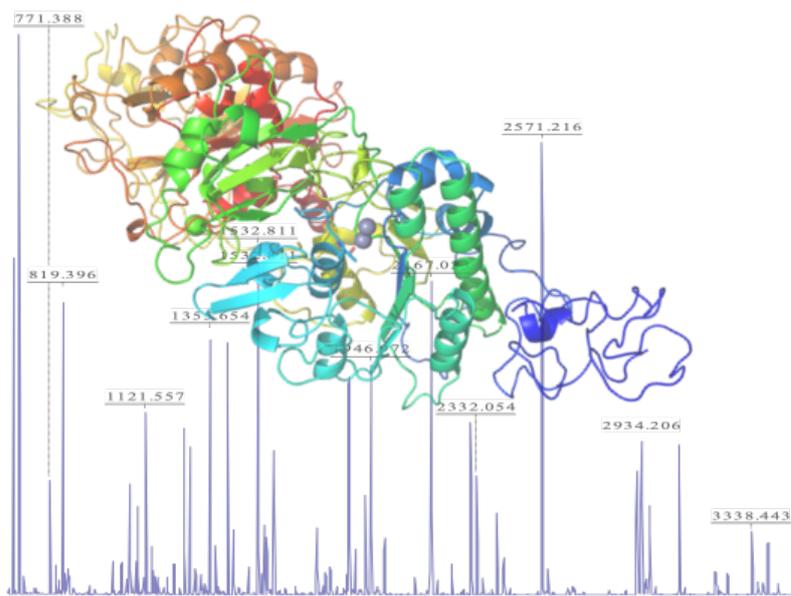


Figura 38. Efeitos da CdcPDE na viabilidade de queratinócitos humanos (N/TERT). (A) Células N/TERT foram incubadas com diferentes concentrações de CdcPDE (10-200 µg/mL) por 24 horas, e a viabilidade celular foi mensurada através de bioluminescência. **** $p < 0,0001$ quando comparado ao controle negativo (células incubadas apenas com o meio de cultura). (B) Valor de IC_{50} da CdcPDE na viabilidade de células N/TERT, utilizando o software GraphPad Prism 8.





5. Conclusões

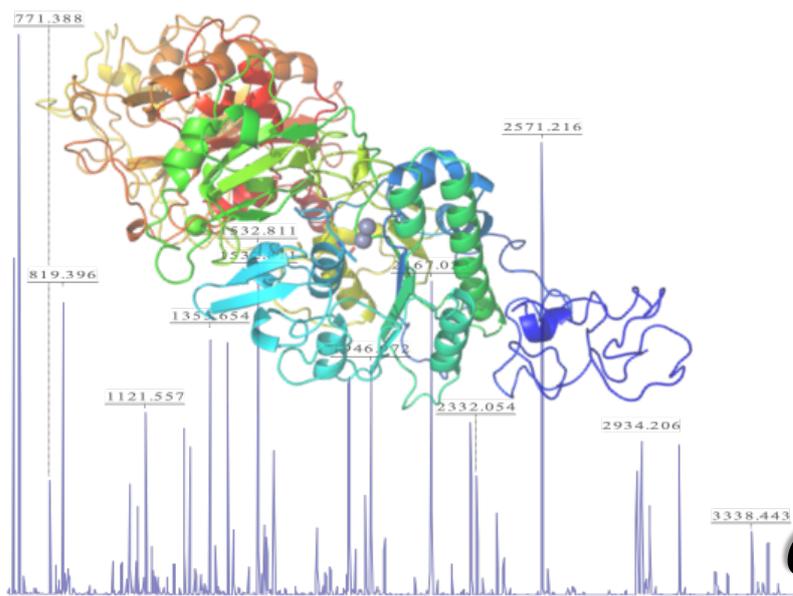
A partir do estudo proposto e os resultados obtidos foi possível determinar uma nova metodologia para a purificação de uma nova PDE da peçonha de *C. d. collilineatus*, isto é, *CdcPDE*, bem como caracterizá-la estruturalmente, bioquimicamente e funcionalmente, mesmo que esta esteja em baixas proporções na peçonha.

Ainda são poucos os estudos que abordam PDE de peçonhas ofídicas. Desta forma, o presente estudo contribui positivamente no conhecimento sobre esta classe de enzimas presente em peçonhas ofídicas, sendo fonte de dados sobre sua estrutura proteica, atividade enzimática, termoestabilidade e citotoxicidade, bem como sua interação com o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*.

Este estudo foi pioneiro em evidenciar a ação citotóxica da *CdcPDE* em queratinócitos humanos, o que pode despertar curiosidade para explorar os efeitos locais de envenenamentos por cascavéis. Além disso, estas enzimas podem ser importantes ferramentas moleculares para a pesquisa, bem como, para a terapêutica, visto que apresentam funções biológicas capazes de interferir tanto processos fisiológicos como patológicos, como o processo de agregação de plaquetas.

Por fim, este estudo encontra-se publicado em revista de âmbito internacional, a *International Journal of Biological Macromolecules*, com fator de impacto de 5.162, intitulado “*Unraveling the structure and function of CdcPDE: A novel phosphodiesterase from Crotalus durissus collilineatus snake venom*”, neste ano de 2021 (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.120). Além do artigo científico, de acordo com os indicadores da CAPES (CAPES, 2019), este estudo também resultou em 3 adicionais produtos tecnológicos não patenteáveis: um novo método de purificação para essa classe de proteína, uma nova sequência de proteína e um novo modelo estrutural.





6. Referências

- AHMADI, S. et al. An in Vitro Methodology for Discovering Broadly-Neutralizing Monoclonal Antibodies. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10765, dez. 2020.
- AIRD, S. D. Ophidian Envenomation Strategies and the Role of Purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335–393, abr. 2002.
- ALEXANDER, G. et al. Gyroxin, a Toxin from the Venom of *Crotalus Durissus Terrificus*, Is a Thrombin-like Enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953–960, 1988.
- AL-SALEH, S. S. M.; KHAN, S. Purification and Characterization of Phosphodiesterase I from *Walterinnesia Aegyptia* Venom. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 262–77, 2011.
- AL-SALEH, S. S. M.; KHAN, S. U.; ASHRAF, M. Biochemical Characterization and Some Biological Properties of the Phosphodiesterase I Purified from *Agistrodon Bilineatus* Venom. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 46, p. 221–229, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Protein Database Searches Using Compositionally Adjusted Substitution Matrices. **The FEBS journal**, v. 272, n. 20, p. 5101–5109, out. 2005.
- ARAÚJO, L. da S. et al. *Crotalus Durissus* Venom: Biological Effects and Relevant Applications. A Review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1981-2965.20160002>>. Acesso em: 24 fev. 2021.
- ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-Type Lectin-like Proteins from Snake Venoms. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 4, p. 512–519, 15 set. 2012.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirão Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 480, 30 dez. 2003.
- BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A. R. The Imaging Properties and Sensitivity of the Facial Pits of Pitvipers as Determined by Optical and Heat-Transfer Analysis. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 16, p. 2801–2810, 15 ago. 2007.
- BALLARD, S. A. et al. Effects of Sildenafil on the Relaxation of Human Corpus Cavernosum Tissue in Vitro and on the Activities of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isozymes. **The Journal of Urology**, v. 159, n. 6, p. 2164–2171, jun. 1998.
- BARBOSA, C. F. et al. Determination of the Neutralizing Potency of Horse Antivenom against Bothropic and Crotalic Venoms by Indirect Enzyme Immunoassay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 10, p. 1077–1080, out. 1995.
- BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 12, n. 45, p. 82–96, 1984.
- BJÖRK, W. Purification of Phosphodiesterase from *Bothrops Atrax* Venom, with Special Consideration of the Elimination of Monophosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 2487–2490, jul. 1963.
- BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of Protein Purification and Characterization Using Thermofluor Screens. **Protein Expression and Purification**, v. 91, n. 2, p. 192–206, out. 2013.



- BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Snake Venomics and Antivenomics of *Crotalus Durissus* Subspecies from Brazil: Assessment of Geographic Variation and Its Implication on Snakebite Management. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758–1776, ago. 2010.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Minor Snake Venom Proteins: Structure, Function and Potential Applications. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, v. 1861, n. 4, p. 824–838, abr. 2017.
- BOLON, I. et al. Identifying the Snake: First Scoping Review on Practices of Communities and Healthcare Providers Confronted with Snakebite across the World. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229989, 5 mar. 2020.
- BON, C. et al. Crotoxin, Half-Century of Investigations on a Phospholipase A2 Neurotoxin. **Acta Physiologica Et Pharmacologica Latinoamericana: Organo De La Asociacion Latinoamericana De Ciencias Fisiologicas Y De La Asociacion Latinoamericana De Farmacologia**, v. 39, n. 4, p. 439–448, 1989.
- BORDON, K. C. F. et al. Isolation, Enzymatic Characterization and Antiedematogenic Activity of the First Reported Rattlesnake Hyaluronidase from *Crotalus Durissus Terrificus* Venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2740–2748, dez. 2012.
- BORDON, K. de C. F. et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1132, 24 jul. 2020.
- BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C. P. Phosphodiesterase Inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S252–S257, jan. 2006.
- BRAZIL, I. V. **A defesa contra o ofidismo**. São Paulo: Pocar & Weiss, 1911.
- BREMEL, R. D.; HOMAN, E. J. An Integrated Approach to Epitope Analysis I: Dimensional Reduction, Visualization and Prediction of MHC Binding Using Amino Acid Principal Components and Regression Approaches. **Immune Research**, v. 6, n. 1, p. 7, 2010.
- BULLOCK, T. H.; COWLES, R. B. Physiology of an Infrared Receptor: The Facial Pit of Pit Vipers. **Science (New York, N.Y.)**, v. 115, n. 2994, p. 541–543, 16 maio 1952.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake Venomics. Strategy and Applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405–1414, nov. 2007.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. [s.l.] Cornell Univ. Press, Ithaca, 2004. v. 65
- CAPES. **Produção Técnica**. [s.l.: s.n.]
- CASTRO, A. et al. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Their Role in Immunomodulatory Responses: Advances in the Development of Specific Phosphodiesterase Inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 2, p. 229–244, mar. 2005.
- CHANG, C. C.; SU, M. J. A Study on the Interaction of Crotoxin with Crotoxin Phospholipase A2, Notexin and Other Presynaptic Neurotoxins. **British Journal of Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 495–503, jun. 1981.
- CHOUMET, V. et al. Snake-Venom Phospholipase A2 Neurotoxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, n. 1–2, p. 57–62, 1993.
- CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de**



- suas propriedades imonológicas.** 1997. Universidade de São Paulo, 1997.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of Protein Structures: Patterns of Nonbonded Atomic Interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, set. 1993.
- CORPET, F. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 25 nov. 1988.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, 2018.
- CUMMINGS, M. D.; FARNUM, M. A.; NELEN, M. I. Universal Screening Methods and Applications of ThermoFluor. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 854–863, out. 2006.
- DA SILVA, M. H.; BIER, O. G. Titration of Antiserum to South American Rattlesnake (*Crotalus Durissus Terrificus*) Venom by Inhibition of Phospholipase A2 Activity. **Toxicon**, v. 20, n. 3, p. 563–569, 1 jan. 1982.
- DELEZENNE, C.; MOREL, H. Action catalytique des venins des serpents sur les acides nucleiques. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, n. 168, p. 244–246, 1919.
- DHANANJAYA, B. L.; D'SOUZA, C. J. M. An Overview on Nucleases (DNase, RNase, and Phosphodiesterase) in Snake Venoms. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 75, n. 1, p. 1–6, jan. 2010.
- DOLAPCHIEV, L. B.; VASSILEVA, R. A.; KOUMANOV, K. S. Venom Exonuclease. II. Amino Acid Composition and Carbohydrate, Metal Ion and Lipid Content in the *Crotalus Adamanteus* Venom Exonuclease. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 622, n. 2, p. 331–336, 25 abr. 1980.
- DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, jun. 2002.
- EDMAN, P.; BEGG, G. A Protein Sequenator. **European Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 80–91, mar. 1967.
- EL-BAKLY, W. et al. The Efficacy and Underlying Mechanism of Phosphodiesterase- 5 Inhibitors in Preventing Cognitive Impairment and Alzheimer Pathology: A Systematic Review of Animal Studies. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112004, out. 2019.
- FERREIRA-JÚNIOR, R. S. **Avaliação da resposta humoral e da capacidade de neutralização do soro de camundongos Swiss inoculados com venenos nativo e irradiado com cobalto-60 de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*.** 2003. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87829>>.
- FOX, J. W. A Brief Review of the Scientific History of Several Lesser-Known Snake Venom Proteins: L-Amino Acid Oxidases, Hyaluronidases and Phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75–82, fev. 2013.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural Considerations of the Snake Venom Metalloproteinases, Key Members of the M12 Reprolysin Family of Metalloproteinases. **Toxicon**, Snake toxins and hemostasis. v. 45, n. 8, p. 969–985, 15 jun. 2005.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of Key Events in Snake Venom Metalloproteinase Research. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200–209, 6 mar. 2009.
- FRANCISCHETTI, I. M. et al. Convulxin, a Potent Platelet-Aggregating Protein from *Crotalus Durissus Terrificus* Venom, Specifically Binds to Platelets. **Toxicon: Official Journal of the**



- International Society on Toxinology**, v. 35, n. 8, p. 1217–1228, ago. 1997.
- FRY, B. G. et al. Evolution of an Arsenal: Structural and Functional Diversification of the Venom System in the Advanced Snakes (Caenophidia). **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 7, n. 2, p. 215–246, fev. 2008.
- GASANOV, S. E. et al. Cobra Venom Cytotoxin Free of Phospholipase A 2 and Its Effect on Model Membranes and T Leukemia Cells. **Journal of Membrane Biology**, v. 155, n. 2, p. 133–142, 15 jan. 1997.
- GEORGATSOS, J. G.; LASKOWSKI, M. Purification of an Endonuclease from the Venom of *Bothrops Atrax* *. **Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 288–295, 1 mar. 1962.
- GONÇALVES, J. M.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 22, p. 141–150, 1950.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a Protein-Small Molecule Docking Web Service Based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Web Server issue, p. W270–277, jul. 2011a.
- GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. Fast Docking Using the CHARMM Force Field with EADock DSS. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2149–2159, 30 jul. 2011b.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 93, abr. 2016.
- GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite Envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 14 set. 2017.
- HABIB, A. G. et al. Snakebite is Under Appreciated: Appraisal of Burden from West Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 23 set. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4580425/>>. Acesso em: 23 abr. 2020.
- HALIM, H. Y. et al. Purification and Characterization of Phosphodiesterase (Exonuclease) from *Cerastes Cerastes* (Egyptian Sand Viper) Venom. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1199–1207, 1987.
- HARRISON, R. A. et al. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 12, p. e569, 22 dez. 2009.
- HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological Roles of the Two Components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 7, p. 1560–1563, jul. 1971.
- HIGUCHI, S. et al. A Novel Peptide from the ACEI/BPP-CNP Precursor in the Venom of *Crotalus Durissus Collilineatus*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 144, n. 2, p. 107–121, out. 2006.
- IBRAHIM, N. M.; SALAMA, W. H.; HAKIM, A. E. E. Phosphodiesterase Activity of Some Egyptian Snake Venoms: Biochemical and Immunological Characteristics and Effect on Blood Coagulation of Phosphodiesterase Enzyme from *Naja Nigricollis* Venom. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 11, 2016.
- IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: **Snake Venoms**. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1979. p. 61–158.
- JACKSON, K. The Evolution of Venom-Conducting Fangs: Insights from Developmental Biology. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 975–981, 1 jun. 2007.



- JENSEN, P. H. et al. Structural Analysis of N- and O-Glycans Released from Glycoproteins. **Nature Protocols**, v. 7, n. 7, p. 1299–1310, 7 jun. 2012.
- JEON, Y. H. et al. Phosphodiesterase: Overview of Protein Structures, Potential Therapeutic Applications and Recent Progress in Drug Development. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 62, n. 11, p. 1198–1220, jun. 2005.
- KAVEH-BAGHBADERANI, Y. et al. Selective Release of Overexpressed Recombinant Proteins from *E. Coli* Cells Facilitates One-Step Chromatographic Purification of Peptide-Tagged Green Fluorescent Protein Variants. **Protein Expression and Purification**, v. 152, p. 155–160, dez. 2018.
- KING, G. F. Venoms as a Platform for Human Drugs: Translating Toxins into Therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469–1484, nov. 2011.
- KINI, R. M.; GOWDA, T. V. Rapid Method for Separation and Purification of Four Isoenzymes of Phosphodiesterase from *Trimeresurus Flavoviridis* (Habu Snake) Venom. **Journal of Chromatography A**, v. 291, p. 299–305, jan. 1984.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
- LAING, G. D. et al. Inflammatory Pathogenesis of Snake Venom Metalloproteinase-Induced Skin Necrosis. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 12, p. 3458–3463, dez. 2003.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.
- LASKOWSKI, Roman A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the Quality of Protein Structures Solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, dez. 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00228148>>. Acesso em: 28 out. 2020.
- LAUSTSEN, A. H. et al. Pros and Cons of Different Therapeutic Antibody Formats for Recombinant Antivenom Development. **Toxicon**, v. 146, p. 151–175, maio 2018.
- LEMA, T.; ARAÚJO, M. L.; AZEVEDO, A. C. P. Contribuição ao conhecimento da alimentação e do modo alimentar de serpentes do Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Zool.** v. 26, n. 1, p. 41–121, 1983.
- LIRA-DA-SILVA, R. M. et al. A contribuição de Vital Brazil para a medicina tropical: dos envenenamentos à especificidade da soroterapia. **Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical**, p. 27- 32 Páginas, 24 jun. 2018.
- MACARTNEY, J. M. Diet of the Northern Pacific Rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*, in British Columbia. **Herpetologica**, v. 45, n. 3, p. 299–304, 1989.
- MACKESSY, S. P. Phosphodiesterases, ribonucleases and deoxyribonucleases. In: **Enzymes from Snake Venoms**. [s.l.] Alaken Press Inc.: Fort Collins, CO, 1998. p. 361–404.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 28 jan. 2015.
- MARLAS, G. Isolation and Characterization of the α and β Subunits of the Platelet-Activating Glycoprotein from the Venom of *Crotalus Durissus Cascavella*. **Biochimie**, v. 67, n. 12, p. 1231–1239, 1 dez. 1985.
- MARQUES, O.; MEDEIROS, C. **Nossas incríveis serpentes: caracterização, biologia, acidentes e conservação**. 1. ed. Cotia (Brasil): Ponto A, 2018.



- MASSIMI, M. et al. Increase of Intracellular Cyclic AMP by PDE4 Inhibitors Affects HepG2 Cell Cycle Progression and Survival. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1401–1411, 2017.
- MCCLEARY, R. J. R. et al. Proteomic Comparisons of Venoms of Long-Term Captive and Recently Wild-Caught Eastern Brown Snakes (*Pseudonaja Textilis*) Indicate Venom Does Not Change Due to Captivity. **Journal of Proteomics**, v. 144, p. 51–62, jul. 2016.
- MEDEIROS, J. M. et al. Fatal Rattlesnake Envenomation in Northernmost Brazilian Amazon: A Case Report and Literature Overview. **Reports — Medical Cases, Images, and Videos**, v. 3, n. 2, p. 9, 8 abr. 2020.
- MEHATS, C. et al. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Their Role in Endocrine Cell Signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 29–35, 1 jan. 2002.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier Editora, 2003. p. 33–61.
- MILLER, C. L.; YAN, C. Targeting Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in the Heart: Therapeutic Implications. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 3, n. 5, p. 507–515, out. 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasil: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- MITRA, J.; BHATTACHARYYA, D. Phosphodiesterase from *Daboia Russelli Russelli* Venom: Purification, Partial Characterization and Inhibition of Platelet Aggregation. **Toxicon**, v. 88, p. 1–10, set. 2014.
- MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 448–462, 22 jun. 2012.
- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. Phosphodiesterase from the Venom of *Crotalus Ruber Ruber*. **The International Journal of Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 115–119, 1987.
- MORSA, D. et al. Multi-Enzymatic Limited Digestion: The Next-Generation Sequencing for Proteomics? **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 6, p. 2501–2513, 7 jun. 2019.
- MURRAY, K. A.; MARTIN, G.; IWAMURA, T. Focus on Snake Ecology to Fight Snakebite. **The Lancet**, v. 395, n. 10220, p. e14, jan. 2020.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l.] ArtMed, 2014a. p. 75–114.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l.] ArtMed, 2014b. p. 189–242.
- NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, set. 2007.



- OGAWA, T. et al. Molecular Diversity and Accelerated Evolution of C-Type Lectin-like Proteins from Snake Venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 1, p. 1–14, jan. 2005.
- OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New View on Crotamine, a Small Basic Polypeptide Myotoxin from South American Rattlesnake Venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 46, n. 4, p. 363–370, 15 set. 2005.
- OLIVEIRA, I. S. et al. Cell Migration Inhibition Activity of a Non-RGD Disintegrin from *Crotalus Durissus Collilineatus* Venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 28, dez. 2018.
- OLIVEIRA, I. S. et al. Global Proteomic and Functional Analysis of *Crotalus Durissus Collilineatus* Individual Venom Variation and Its Impact on Envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 191, p. 153–165, 16 2019.
- PANTOLIANO, M. W. et al. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, n. 6, p. 429–440, dez. 2001.
- PAPPIN, D. J.; HOJRUP, P.; BLEASBY, A. J. Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. **Current biology: CB**, v. 3, n. 6, p. 327–332, 1 jun. 1993.
- PEIGNEUR, S. et al. Crotamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. **Molecular Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 90–96, 1 jul. 2012.
- PENG, L. et al. Purification and Partial Characterization of a Novel Phosphodiesterase from the Venom of *Trimeresurus Stejnegeri*: Inhibition of Platelet Aggregation. **Biochimie**, v. 93, n. 9, p. 1601–1609, set. 2011.
- PÉREZ-TORRES, S. et al. Alterations on Phosphodiesterase Type 7 and 8 Isozyme MRNA Expression in Alzheimer's Disease Brains Examined by in Situ Hybridization. **Experimental Neurology**, v. 182, n. 2, p. 322–334, ago. 2003.
- PERRON, S.; MACKESSY, S. P.; HYSLOP, R. M. Purification and characterization of exonuclease from rattlesnake venom. **Journal of the Colorado-Wyoming Academy of Science**, v. 25, p. 21–22, 1993.
- PERRY, M. J.; HIGGS, G. A. Chemotherapeutic Potential of Phosphodiesterase Inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 472–481, ago. 1998.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- PHILIPPS, G. R. Purification and Characterization of Phosphodiesterase from Crotalus Venom. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**, v. 356, n. 7, p. 1085–1096, jul. 1975.
- PHILIPPS, G. R. Purification and Characterization of Phosphodiesterase I from *Bothrops Atrax*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 432, n. 2, p. 237–244, 3 maio 1976.
- PIERINI, S. V. et al. High Incidence of Bites and Stings by Snakes and Other Animals among Rubber Tappers and Amazonian Indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil. **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 225–236, fev. 1996.
- POKLAR, N. et al. PH and Temperature-Induced Molten Globule-like Denatured States of Equinatoxin II: A Study by UV-Melting, DSC, Far- and near-UV CD Spectroscopy, and ANS Fluorescence. **Biochemistry**, v. 36, n. 47, p. 14345–14352, 25 nov. 1997.



- PUCCA, M. B. et al. Electrophysiological Characterization of the First *Tityus Serrulatus* Alpha-like Toxin, Ts5: Evidence of a pro-Inflammatory Toxin on Macrophages. **Biochimie**, v. 115, p. 8–16, ago. 2015.
- PUCCA, M. B. et al. Unity Makes Strength: Exploring Intraspecies and Interspecies Toxin Synergism between Phospholipases A2 and Cytotoxins. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 611, 7 maio 2020.
- QUINTON, L. et al. Fourier Transform Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Toxin Analysis. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 6, p. 715–726, maio 2006.
- RADVANYI, F. et al. Binding of Crotoxin, a Presynaptic Phospholipase A2 Neurotoxin, to Negatively Charged Phospholipid Vesicles. **Journal of Neurochemistry**, v. 53, n. 4, p. 1252–1260, out. 1989.
- REY-SUÁREZ, P. et al. Integrative Characterization of the Venom of the Coral Snake *Micrurus Dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, Toxicity, and Cross-Neutralization by Antivenom. **Journal of Proteomics**, v. 136, p. 262–273, mar. 2016.
- RIVEL, M. et al. Pathogenesis of Dermonecrosis Induced by Venom of the Spitting Cobra, *Naja Nigricollis*: An Experimental Study in Mice. **Toxicon**, v. 119, p. 171–179, set. 2016.
- RUSSELL, F. E.; BUESS, F. W.; WOO, M. Y. Zootoxicological Properties of Venom Phosphodiesterase. **Toxicon**, v. 1, n. 3, p. 99–108, 1 out. 1963.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. **Proteins**, v. 65, n. 1, p. 40–48, 1 out. 2006.
- SANTORO, M. L. et al. NPP-BJ, a Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase from *Bothrops Jararaca* Snake Venom, Inhibits Platelet Aggregation. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 499–512, 15 set. 2009.
- SCHENBERG, S. Geographical Pattern of Crotamine Distribution in the Same Rattlesnake Subspecies. **Science**, v. 129, n. 3359, p. 1361–1363, 15 maio 1959.
- SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-Modeling Server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381–3385, 1 jul. 2003.
- SEGOVIA, M.; FIGUEROA, F. L. Detection of a 3', 5'-Cyclic-AMP Phosphodiesterase Activity in the Lichenized Fungus *Evernia Prunastri*. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 141, n. 1, p. 123–127, mar. 2007.
- SELVANAYAGAM, Z. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Tests for Detection of Snake Venoms, Toxins and Venom Antibodies: Review on Recent Trends (1987-1997). **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 565–586, abr. 1999.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake Venom Serine Proteinases: Sequence Homology vs. Substrate Specificity, a Paradox to Be Solved. **Toxicon**, Snake toxins and hemostasis. v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 15 jun. 2005.
- SIVALINGAM, G. N.; SHEPHERD, A. J. An Analysis of B-Cell Epitope Discontinuity. **Molecular Immunology**, v. 51, n. 3–4, p. 304–309, jul. 2012.
- STOWELL, S. R.; JU, T.; CUMMINGS, R. D. Protein Glycosylation in Cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 10, p. 473–510, 2015.
- STOYNOV, S. S. et al. Single-Strand-Specific DNase Activity Is an Inherent Property of the 140-KDa Protein of the Snake Venom Exonuclease. **FEBS letters**, v. 409, n. 2, p. 151–154, 9 jun. 1997.



- STRACK, R. Solving the Primary Structure of Peptides. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 11–11, out. 2015.
- SUGIHARA, H. et al. Purification and Characterization of Phosphodiesterase from the Venom of *Trimeresurus Mucrosquamatus*. **The International Journal of Biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 203–207, 1986.
- TABORDA, A. R. et al. A Study of the Desoxyribonuclease Activity of Snake Venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 207–213, mar. 1952a.
- TABORDA, A. R. et al. A Study of the Ribonuclease Activity of Snake Venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 194, n. 1, p. 227–233, jan. 1952b.
- TAN, N. H. et al. Functional Venomics of the Sri Lankan Russell's Viper (*Daboia Russelii*) and Its Toxinological Correlations. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 403–423, 14 out. 2015a.
- TAN, C. H. et al. Venom-gland transcriptome and venom proteome of the Malaysian king cobra (*Ophiophagus hannah*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 687, 10 set. 2015b.
- TANG, E. L. H. et al. Venomics of *Calloselasma Rhodostoma*, the Malayan Pit Viper: A Complex Toxin Arsenal Unraveled. **Journal of Proteomics**, v. 148, p. 44–56, 04 2016.
- THEAKSTON, R. D.; LLOYD-JONES, M. J.; REID, H. A. Micro-ELISA for Detecting and Assaying Snake Venom and Venom-Antibody. **Lancet**, v. 2, n. 8039, p. 639–641, 24 set. 1977.
- THOMAZINI, I. A.; BARRAVIERA, B.; BARRAVIERA, B. Alterações hematológicas nos acidentes por animais peçonhentos. In: **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994. p. 81–96.
- TOKARNIA, C. H. et al. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops* spp. em animais de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 301–312, abr. 2014.
- TOYAMA, M. H. et al. Isolation and Characterization of a Convulxin-like Protein from *Crotalus Durissus Collilineatus* Venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 585–591, out. 2001.
- TRUMMAL, K. et al. Phosphodiesterase from *Vipera Lebetina* Venom - Structure and Characterization. **Biochimie**, v. 106, p. 48–55, nov. 2014.
- UCKERT, S. et al. Update on Phosphodiesterase (PDE) Isoenzymes as Pharmacologic Targets in Urology: Present and Future. **European Urology**, v. 50, n. 6, p. 1194–1207; discussion 1207, dez. 2006.
- UETZ, P. **The Reptile Database**. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- ULLAH, A. et al. The Sequence and a Three-Dimensional Structural Analysis Reveal Substrate Specificity among Snake Venom Phosphodiesterases. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 625, nov. 2019.
- UZAWA, S. Über Die phosphomonoesterase und die phosphodiesterase. **The Journal of Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 19–28, 1932.
- VALÉRIO, A. A. et al. Purification and Characterization of a Phosphodiesterase from *Bothrops Alternatus* Snake Venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 495–503, nov. 2002.
- VARGAFTIG, B. B. et al. Activation of Guinea-Pig Platelets Induced by Convulxin, a Substance Extracted from the Venom of *Crotalus Durissus Cascavella*. **European Journal of Pharmacology**, v.



68, n. 4, p. 451–464, 19 dez. 1980.

VONK, F. J. et al. Evolutionary Origin and Development of Snake Fangs. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 630–633, jul. 2008.

WARRELL, D. A. Snake Bite. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9708, p. 77–88, 2 jan. 2010.

WARRELL, D. A. Venomous Bites, Stings, and Poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 207–223, jun. 2012.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WHO. **Snakebite envenoming - Key facts 2019**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

WIEZEL, G. A. et al. In-Depth Venome of the Brazilian Rattlesnake *Crotalus Durissus Terrificus*: An Integrative Approach Combining Its Venom Gland Transcriptome and Venom Proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 17, n. 11, p. 3941–3958, 02 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (ed.). **Rabies and envenomings: a neglected public health issue ; report of a consultative meeting, World Health Organization, Geneva, 10 January 2007**. Geneva: WHO, 2007.

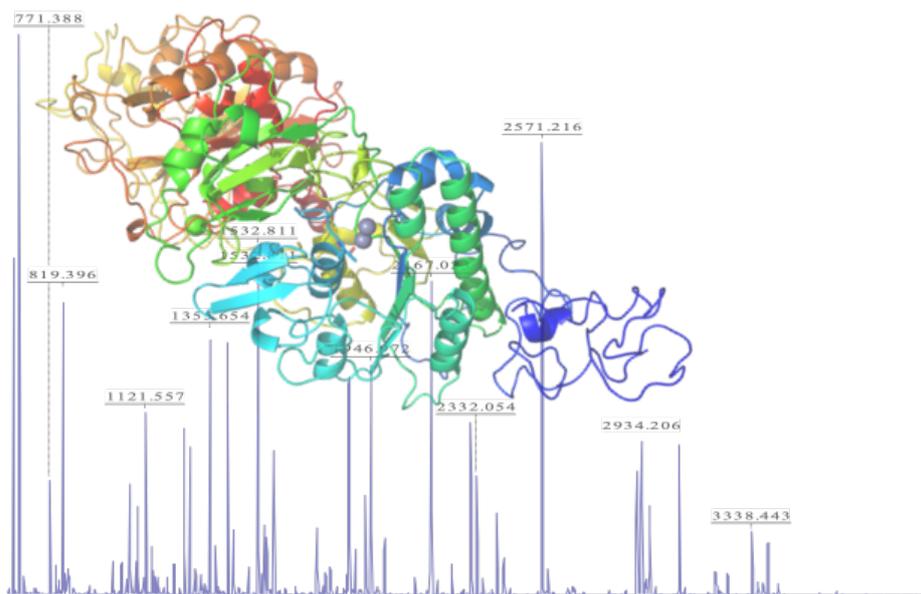
WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins**. [s.l: s.n.]

YANG, Z.-M. et al. Transcriptome and Proteome of the Highly Neurotoxic Venom of *Gloydius Intermedius*. **Toxicon**, v. 107, n. Pt B, p. 175–186, 1 dez. 2015.

YATES, J. R. Mass Spectrometry. From Genomics to Proteomics. **Trends in genetics: TIG**, v. 16, n. 1, p. 5–8, jan. 2000.

ZALATAN, J. G. et al. Structural and Functional Comparisons of Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase and Alkaline Phosphatase: Implications for Mechanism and Evolution,. **Biochemistry**, v. 45, n. 32, p. 9788–9803, 1 ago. 2006.





Anexos

Anexo 1. Certificado de Regularidade do serpentário da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto (FMRP/USP) para a utilização de peçonhas animais emitido pelo Instituto Brasileiro de Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (IBAMA).

 	
Ministério do Meio Ambiente Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis CADASTRO TÉCNICO FEDERAL CONSULTA PÚBLICA A CERTIFICADO DE REGULARIDADE - CR	
Registro n.º:	1506748
Data da consulta:	16/03/2021
CR emitido em:	16/03/2021
CR válido até:	16/06/2021
Dados básicos	
CNPJ:	63.025.530/0026-62
Razão social:	FACULDADE DE MEDICINA DE RIBEIRÃO PRETO - USP
Nome fantasia:	FMRP - CRIADOURO CIENTÍFICO DA USP
Data de abertura:	21/05/1952
Endereço	
Logradouro:	AV. BANDEIRANTES 3900
Complemento:	CAMPUS DA USP
N.º:	3900
Município:	RIBEIRAO PRETO
Bairro:	MONTE ALEGRE
UF:	SP
CEP:	14049-900
Cadastro Técnico Federal de Atividades Potencialmente Poluidoras e Utilizadoras de Recursos Ambientais – CTF/APP	
Categoria	Detalhe
21 - Atividades não relacionadas no Anexo VIII da Lei nº 6.938/1981	55 - Criação científica de fauna exótica e de fauna silvestre - Resolução CONAMA nº 489/2018: art. 4º, III
Conforme dados disponíveis na presente data, a pessoa jurídica acima possui Certificado de Regularidade em conformidade com as obrigações cadastrais e de prestação de informações ambientais sobre as atividades desenvolvidas sob controle e fiscalização do Ibama, por meio do CTF/APP.	
O certificado de regularidade emitido pelo CTF/APP não desobriga a pessoa inscrita de obter licenças, autorizações, permissões, concessões, alvarás e demais documentos exigíveis por instituições federais, estaduais, distritais ou municipais para o exercício de suas atividades.	
O Certificado de Regularidade do CTF/APP não habilita o transporte e produtos e subprodutos florestais e faunísticos.	
Fechar	



Anexo 2: Certificado de aprovação deste projeto emitido pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto (FCFRP/USP).



UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto
 Comitê de Ética em Pesquisa

Of. CEP/FCFRP nº. 023/2017
 kms

Ribeirão Preto, 12 de maio de 2017.

À pós-graduanda
Isadora Sousa de Oliveira
 Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Eliane Candiani Arantes Braga
 Departamento de Física e Química
 FCFRP/USP

Prezada Pesquisadora,

Informamos que o projeto de pesquisa intitulado “**AVALIAÇÃO BIOQUÍMICA, ESTRUTURAL E FUNCIONAL DE UMA FOSFODIESTERASE DA PEÇONHA DE CROTALUS DURISSUS COLLILINEATUS**”, apresentado por Vossa Senhoria a este Comitê, Protocolo **CEP/FCFRP nº. 435 - CAAE nº 64850717.8.0000.5403**, foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FCFRP/USP em sua 163^a reunião ordinária, conforme Parecer Consubstanciado do CEP nº 2.060.624.

Lembramos que, de acordo com a Resolução 466/2012, item IV.5, letra d, o TCLE deverá “ser elaborado em duas vias, rubricadas em todas as suas páginas e assinadas, ao seu término, pelo convidado a participar da pesquisa, ou por seu representante legal, assim como pelo pesquisador responsável, ou pela(s) pessoa(s) por ele delegada(s), devendo as páginas de assinaturas estar na mesma folha. Em ambas as vias deverão constar o endereço e contato telefônico ou outro, dos responsáveis pela pesquisa e do CEP local”.

Informamos que deverá ser encaminhado ao CEP o relatório final da pesquisa em formulário próprio deste Comitê, bem como comunicada qualquer alteração, intercorrência ou interrupção do mesmo, tais como eventos adversos e eventuais modificações no protocolo ou nos membros da equipe, através da interposição de emenda na Plataforma Brasil.

Atenciosamente,

PROF^ª. DR^ª. CLENI MARA MARZOCCHI MACHADO
 Coordenadora do CEP/FCFRP

