

CAROLINE SERINO SILVA

**O estudo ontogenético da composição de inibidores de veneno de
serpentes e a avaliação da atividade neutralizante do γ -PLI presente
no plasma de *Bothrops jararaca***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação
Interunidades em Biotecnologia da Universidade
de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de
Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de
Doutor em Biotecnologia.

São Paulo

2021

CAROLINE SERINO SILVA

**O estudo ontogenético da composição de inibidores de veneno de
serpentes e avaliação da atividade neutralizante do γ -PLI presente
no plasma da serpente *Bothrops jararaca***

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da Universidade de São Paulo, Instituto Butantan e Instituto de Pesquisas Tecnológicas para obtenção do Título de Doutor em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia
Orientador(a): Dra. Anita Mítico Tanaka-Azevedo

Co-orientador (a): Dra. Karen de Moraes-Zani

Versão corrigida. A versão original eletrônica, encontra-se disponível tanto na Biblioteca no ICB quanto na Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da USP (BDTD).

São Paulo

2021

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

Ficha Catalográfica elaborada pelo(a) autor(a)

Serino-Silva, Caroline
O estudo ontogenético da composição de inibidores
de veneno de serpentes e a avaliação da atividade
neutralizante do γ -PLI presente no plasma de
Bothrops jararaca / Caroline Serino-Silva;
orientadora Anita Mitico Tanaka-Azevedo;
coorientadora Karen de Moraes-Zani. -- São Paulo,
2021.
118 p.

Tese (Doutorado) -- Universidade de São Paulo,
Instituto de Ciências Biomédicas.

1. Fosfolipase A2. 2. Envenenamento. 3. Inibidor
de PLA2. 4. Serpente peçonhenta. I. Mitico Tanaka-
Azevedo, Anita, orientador. II. de Moraes-Zani,
Karen, coorientador. III. Título.

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

Candidato(a): Caroline Serino Silva

Título da Tese: O estudo ontogenético da composição de inibidores de veneno de serpentes e avaliação da atividade neutralizante do γ -PLI presente no plasma da serpente *Bothrops jararaca*.

Orientador: Dra. Anita Mítico Tanaka-Azevedo.

Co-orientador: Dra. Karen de Moraes-Zani.

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

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

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Examinador(a): Assinatura:
Nome:
Instituição:

Presidente: Assinatura:
Nome:
Instituição:

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "O estudo ontogenético da composição de inibidores de veneno de serpentes e a avaliação da atividade neutralizante do gama-PLI presente no plasma de *Bothrops jararaca*", protocolada sob o CEUA nº 7751060117 (00013902), sob a responsabilidade de **Anita Mítico Tanaka Azevedo e equipe**; *Caroline Serino Silva* - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 19/09/2018.

We certify that the proposal "Ontogenetic study of the composition of snake venom inhibitors and the evaluation of the gama-PLI neutralizing activity present in *Bothrops jararaca* plasma", utilizing 90 Reptiles (males and females), 50 Heterogenics mice (50 males), 1 Rabbits (1 females), protocol number CEUA 7751060117 (00013902), under the responsibility of **Anita Mítico Tanaka Azevedo and team**; *Caroline Serino Silva* - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/19/2018.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **02/2017** a **12/2018** Área: **Herpetologia**

Origem:	Animais provenientes de outros estudos	sexo:	Machos e Fêmeas	idade:	0 a 13 anos	N:	90
Espécie:	Répteis			Peso:	50 a 1500 g		
Linhagem:	Viperídeos						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Machos	idade:	3 a 4 semanas	N:	50
Espécie:	Camundongos heterogênicos			Peso:	18 a 22 g		
Linhagem:	Swiss						
Origem:	Biotério Central	sexo:	Fêmeas	idade:	60 a 60 dias	N:	1
Espécie:	Coelhos			Peso:	2 a 2 kg		
Linhagem:	Branco Nova Zelândia						

Local do experimento: **Biotério Experimental do Laboratório de Herpetologia**

São Paulo, 07 de janeiro de 2021



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Cordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Estudo ontogenético da composição de inibidores de veneno de serpentes e a avaliação da atividade neutralizante do gama-PLI presente no plasma de *Bothrops jararaca*", protocolada sob o CEUA nº 7598110219 (ID 001824), sob a responsabilidade de **Anita Mitico Tanaka Azevedo e equipe; Caroline Serino Silva** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 18/09/2019.

We certify that the proposal "Ontogenetic study of the composition of snake venom inhibitors and the evaluation of the gama-PLI neutralizing activity present in *Bothrops jararaca* plasma ", utilizing 60 Heterogenics mice (60 males), protocol number CEUA 7598110219 (ID 001824), under the responsibility of **Anita Mitico Tanaka Azevedo and team; Caroline Serino Silva** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/18/2019.

Finalidade da Proposta: **Pesquisa**

Vigência da Proposta: de **03/2019** a **04/2021** Área: **Herpetologia**

Origem: **Biotério Central**

Espécie: **Camundongos heterogênicos**

sexo: **Machos**

idade: **3 a 4 semanas**

N: **60**

Linagem: **Swiss**

Peso: **18 a 22 g**

Local do experimento: **Biotério Experimental do Laboratório de Herpetologia**

São Paulo, 07 de janeiro de 2021



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Ilmo(a). Sr(a).
Responsável: Anita Mítico Tanaka Azevedo
Área: Herpetologia

Título da proposta: "Estudo ontogenético da composição de inibidores de veneno de serpentes e a avaliação da atividade neutralizante do gama-PLI presente no plasma de *Bothrops jararaca*".

Parecer Consubstanciado da Comissão de Ética no Uso de Animais IB (ID 003471)

A Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan, no cumprimento das suas atribuições, analisou e **APROVOU** a Emenda (versão de 23/julho/2020) da proposta acima referenciada.

Resumo apresentado pelo pesquisador: "Venho por meio desta solicitar a inclusão de um novo experimento no projeto de pesquisa referente ao protocolo 7598110219. O presente trabalho tem como objetivo o estudo comparativo da composição proteica do plasma de filhotes e adultos de *B. jararaca*, com enfoque para a presença de proteínas capazes de inibir toxinas presentes no veneno de serpentes. Além de estudar a possível neutralização das atividades de fosfolipases A2 isoladas do veneno de *C. durissus terrificus* (D-49 PLA2) e *B. jararacussu* (K-49 PLA2) utilizando o yPLI isolado do soro de *B. jararaca*. Considerando que os plasmas de serpentes ainda são pouco caracterizados, existe uma dificuldade para identificar as proteínas presentes nele, principalmente devido ao baixo número de proteínas descritas e depositadas em bancos de dados. Sendo assim, uma das formas de compararmos os perfis de inibidores presentes no plasma das serpentes da espécie *B. jararaca* tem sido através de um experimento indireto, no qual é avaliado o imuno reconhecimento entre as proteínas do veneno e as do plasma. Entretanto, para uma quantificação mais específica, podem ser utilizados anticorpos específicos. Para isso, é necessária a produção de anticorpos policlonais anti-yBjPLI em camundongos Balb C, para posterior avaliação da presença e quantificação do yBjPLI, no plasma de filhotes e adultos de *B. jararaca* (CEUAIB 7751060117), por Western blotting e ELISA. Deste modo, anticorpos anti- yBjPLI serão produzidos em 10 camundongos fêmeas Balb C (18 a 22 g) por injeção subcutânea de 100 µL de PBS contendo 10 µg de yBjPLI isolada (CEUAIB 7751060117) e 50 µg de hidróxido de alumínio como adjuvante, por camundongo. Duas injeções de reforço adicionais serão administradas 10 e 20 dias após a primeira injeção. O sangue (100-200 µL/animal) será coletado por punção do plexo ocular, após administração do colírio anestésico Anestalcon, e o soro será obtido após centrifugação a 1500 g. Após os experimentos, os animais serão eutanasiados por inalação gradual de CO2, armazenados em saco plástico branco (contendo o número de carcaças, o peso total e a espécie/linhagem dos animais) e as carcaças serão então armazenadas a -20°C e posteriormente devidamente encaminhadas para a Comissão de Resíduos para o descarte adequado. Este novo experimento será acompanhado pela Dra Marisa Maria Teixeira da Rocha, profissional com vasta experiência nesse tipo de trabalho. Além disso, devido ao atraso no cronograma provocado pela pandemia do COVID-19, e adição de um novo experimento, solicitamos também a alteração de vigência deste protocolo, com data prevista de encerramento em julho de 2021. Atenciosamente, Anita Mítico Tanaka-Azevedo".

Comentário da CEUA: ""

[Animais a serem adicionados](#)

Origem:	Biotério Central		
Espécie:	Camundongos isogênicos	sexo:	Fêmeas
Linhagem:	Balb/c	idade:	3 a 4 semanas
		N:	10
		Peso:	18 a 22 g

[Pesquisador adicionado:](#)

E-mail:	marisa.rocha@butantan.gov.br	Telefone:	26279830
Nome:	Marisa Maria Teixeira da Rocha		
Instituição:	Instituto Butantan	Nível:	Graduado
Vínculo:	Técnico de Nível Superior		
Experiência:	Sim: 30 anos (ano)	Treinamento:	Sim: 24 anos (hora)
Cv. Lattes:	http://lattes.cnpq.br/5346041323318636		
Setor:	Herpetologia	Função:	Executante

Nova previsão de término da proposta: **07/2021**



*Comissão de Ética no
Uso de Animais*

Maria Leonor Samo de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Nancy Ogulura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

CERTIFICADO

Certificamos que a proposta intitulada "Inibição da atividade anticoagulante da crotoxina usando PLIs provenientes do plasma de *Bothrops jararaca* e *Boa constrictor*", protocolada sob o CEUA nº 7769050219 (ID 001790), sob a responsabilidade de **Anita Mítico Tanaka Azevedo e equipe; Caroline Serino Silva; Benedito Carlos Prezoto; Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues** - que envolve a produção, manutenção e/ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto o homem), para fins de pesquisa científica ou ensino - está de acordo com os preceitos da Lei 11.794 de 8 de outubro de 2008, com o Decreto 6.899 de 15 de julho de 2009, bem como com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle da Experimentação Animal (CONCEA), e foi **aprovada** pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB) na reunião de 04/09/2019.

We certify that the proposal "Inhibition of anticoagulant activity of crotoxin using PLIs from *Bothrops jararaca* and *Boa constrictor* plasma ", utilizing 5 Birds (5 females), protocol number CEUA 7769050219 (ID 001790), under the responsibility of **Anita Mítico Tanaka Azevedo and team; Caroline Serino Silva; Benedito Carlos Prezoto; Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues** - which involves the production, maintenance and/or use of animals belonging to the phylum Chordata, subphylum Vertebrata (except human beings), for scientific research purposes or teaching - is in accordance with Law 11.794 of October 8, 2008, Decree 6899 of July 15, 2009, as well as with the rules issued by the National Council for Control of Animal Experimentation (CONCEA), and was **approved** by the Ethic Committee on Animal Use of the Butantan Institute (CEUAIB) in the meeting of 09/04/2019.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [02/2019](#) a [02/2021](#) Área: [Herpetologia](#)

Origem: [Biotério Externo](#)

Espécie: [Aves](#)

sexo: [Fêmeas](#)

idade: [1 a 7 anos](#)

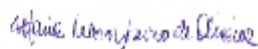
N: [5](#)

Linhagem: [Gallus gallus](#)

Peso: [2 a 3 kg](#)

Local do experimento: Biotério do laboratório de farmacologia.

São Paulo, 22 de março de 2021



Maria Leonor Sarno de Oliveira
Coordenador da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan



Nancy Oguiura
Vice-Coordenadora da Comissão de Ética no Uso de Animais
Instituto Butantan

Aos meus pais, Antônio Carlos e Arlete, pelo incentivo, apoio e amor de sempre.

A chama de uma única vela é
capaz de iluminar a escuridão.

Solange dos Anjos Castanheira

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Anita Mitico Tanaka-Azevedo, por ter sido uma grande amiga e conselheira no trabalho e na vida, por fazer possível a execução deste trabalho, pela melhor orientação que eu poderia receber e por ser a responsável por esse grande grupo de trabalho do qual fazemos parte.

À minha família, meu pai Antônio Carlos, minha mãe Arlete, minha irmã, Jackeline e meu namorado Franklin, pelo apoio e compreensão em todos os momentos da minha vida.

À minha co-orientadora, Karen de Moraes-Zani, pela companhia, pelos ensinamentos e atenção minuciosa de sempre.

À diretora do Laboratório de Herpetologia, Kathleen Fernandes Grego, pela ótima direção e organização, pensando sempre no bem-estar dos animais, dos funcionários e no funcionamento como um todo.

À Dra. Aparecida Sadae Tanaka, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pela paciência, generosidade, atenção e ensinamentos.

À Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha, do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, pela disposição e auxílio na produção dos anticorpos anti- γ BjPLI.

Ao Dr. Benedito Carlos Prezoto, do Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, pelo auxílio nos experimentos de tromboelastometria.

Ao Dr. Marcos Hikari Toyama, do Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista, pelas fosfolipases A₂ isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, e pelo auxílio nos experimentos de difração circular.

Ao Dr. Alexandre Keiji Tashima e seu aluno Jackson Gabriel Miyamoto, do Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP), pelos experimentos de espectrometria de massas.

Ao Dr. Sávio Stefanini Sant'Anna, pelas belas fotos cedidas e pela manutenção das serpentes no biotério de Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan.

À Caroline Fabri, pela amizade, companheirismo e auxílio no desvendamento dos trabalhos com inibidores de fosfolipases A₂.

À Nathália da Costa Galizio, pela amizade, companheirismo e auxílio na obtenção do sangue das serpentes.

À Verônica de Moraes Manzato, pela amizade, companheirismo e auxílio nos experimentos de clonagem e expressão do γ BjPLI.

A todos os alunos que passaram pelo laboratório durante a execução deste trabalho, em especial aos meus amigos Beatriz, Daniel, Daniela, Danilo, Eduardo, Juan, Leticia, Lídia, Luísa, Victor e Wesley.

Aos alunos e funcionários do laboratório de bioquímica da UNIFESP, pelas discussões de trabalho, em especial para o Dr. Ricardo Torquato, Moiaxi, Fernando, Jacilene, Natália, Fabio, Gabriel, Lucas, Camila, Sophie e Maria Eduarda.

A todos os funcionários e alunos do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan que fizeram direta ou indiretamente este trabalho ser possível, obrigada também por proporcionarem um ambiente agradável de união e gostoso de se trabalhar.

A todos que fazem parte da secretaria do programa de pós-graduação Interunidades em Biotecnologia da USP, em especial ao Dr. José Gregório Cabrera Gomez, e às secretárias Fábria e Eliane.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, CAPES, e a Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo, FAPESP (2018/25786-0), pelo apoio financeiro.

O presente trabalho foi realizado com apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

SERINO-SILVA, C. **O estudo ontogenético da composição de inibidores de veneno de serpentes e avaliação da atividade neutralizante do γ -PLI presente no plasma da serpente *Bothrops jararaca*.** 2021. 118 folhas. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Os inibidores naturais de venenos de serpentes têm sido estudados há mais de um século. Entre eles, estão as proteínas de plasma de alguns mamíferos e de serpentes não peçonhentas e peçonhentas, que possuem a capacidade de promover uma resistência ao veneno. Estas proteínas têm despertado o interesse biotecnológico, já que são uma ótima alternativa para o desenvolvimento de novos fármacos. As principais proteínas encontradas no plasma desses animais, com capacidade de neutralização do veneno, são os inibidores de metaloproteinases e os inibidores de PLA₂ (PLIs). A PLA₂ atua no efeito local do envenenamento, causando inflamação do tecido na área afetada. Nesse contexto, recentemente foi isolado o γ BjPLI, que é um PLI presente no sangue da serpente peçonhenta *Bothrops jararaca*. Esta proteína pertence à classe gama (γ), com base em domínios estruturais característicos. O γ BjPLI possui aproximadamente 22 kDa e inibe as atividades enzimáticas, edematogênicas e mionecróticas das PLA₂, sugerindo um papel desse inibidor na proteção dessas serpentes contra o autoenvenenamento. Baseado nessas informações, neste trabalho foi estudado de forma comparativa a composição proteica do plasma de neonatos, jovens e adultos, fêmeas e machos de *B. jararaca*, por análises de SDS-PAGE, *Western blotting*, cromatografia de afinidade, ELISA e espectrometria de massa. Tais análises permitiram identificar proteínas do tipo PLI (α PLI, β PLI e γ PLI) em todas as fases da vida, sendo que α PLI e β PLI foram identificados pela primeira vez no plasma da serpente *B. jararaca*. Também foi realizada a avaliação da interação e neutralização da atividade anticoagulante da crotoxina por tromboelastometria, em que o γ BjPLI foi capaz de inibir até 82% da atividade dessa toxina. Ademais, mostrou uma maior afinidade pela PLA₂ Asp-49 em comparação à PLA₂ Lys-49, tanto por apresentar uma alteração em espectros obtidos por dicroísmo circular, quanto pela inibição das atividades miotóxicas e edematogênicas, com valores de 19,6% e 38,5% para a PLA₂ Asp-49, superiores aos 16% e 19,6% para a PLA₂ Lys-49, respectivamente. Além disso, para estabelecer novos métodos de obtenção destes inibidores com maiores rendimentos mantendo a estabilidade e atividade, o γ BjPLI foi clonado e expresso utilizando o vetor pET28a e a cepa de expressão *SHuffle* da espécie de bactéria *Escherichia coli*.

Palavras chaves: Fosfolipase A₂. Envenenamento. Inibidor de PLA₂. Serpente peçonhenta.

ABSTRACT

SERINO-SILVA, C. **Ontogenetic study of the composition of snake venom inhibitors and evaluation of the neutralizing activity of the γ -PLI present in the plasma of *Bothrops jararaca* snake.** 2021. 118 folhas. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Snake venom inhibitors have been studied for over a century. Among them are the plasma proteins of some mammals and of non-venomous and venomous snakes, which have the ability to promote resistance to the venom. These proteins have aroused biotechnological interest, as they are an excellent alternative for the development of new drugs. The main proteins found in animal plasma, capable of neutralizing venom, are metalloproteinase inhibitors and PLA₂ inhibitors (PLIs). The PLA₂ acts in the local effect of envenomation, causing tissue inflammation in the affected area. Based on this information, γ BjPLI was recently isolated, which is a PLI present in the blood of the venomous snake *Bothrops jararaca*. γ BjPLI belongs to the gamma (γ) class, based on its characteristic domains. γ BjPLI has approximately 22 kDa and inhibits the enzymatic, edematogenic and myonecrotic activities of PLA₂, suggesting a role of this inhibitor in the protection of these snakes against self-envenomation. Knowing that, in this work it is presented a comparative study of the protein composition of the plasma of newborns, young and adults, females and males of *B. jararaca*, by analysis of SDS-PAGE, Western blotting, affinity chromatography, ELISA and mass spectrometry. Such analysis allowed to identify PLI-like proteins (α PLI, β PLI and γ PLI) at all stages of life, with α PLI and β PLI were being found for the first time in the *B. jararaca* snake plasma. An evaluation of the interaction and neutralization of crotoxin anticoagulant activity by thromboelastometry was also performed, and γ BjPLI was able to inhibit up to 82% of the activity. In addition, it showed a greater affinity for PLA₂ Asp-49 compared to PLA₂ Lys-49, evidenced by an alteration in spectra obtained by circular dichroism, and by the inhibition of myotoxic and edematogenic activities, with values of 19.6% and 38.5% for PLA₂ Asp-49, higher than 16% and 19.6% for PLA₂ Lys-49, respectively. Furthermore, to establish new methods for obtaining these inhibitors with greater yield, stability, and activity, γ BjPLI was cloned and expressed using the pET28a vector and a SHuffle expression strain of the bacterium species *Escherichia coli*.

Keywords: Phospholipases A₂. Envenomation. PLA₂ inhibitor. Venomous snakes.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

4N3OBA – *4-Nitro-3-(octanoyloxy)benzoic acid*

°C – graus Celsius

µg – microgramas

µL – microlitro

A₂₈₀ – absorvância 280 nanômetros

AF - adultos fêmeas

AM - adultos machos

ANOVA – análise de variância

antiIgG – anti imunoglobulina do tipo G

Asp-49 – resíduo de aminoácido ácido aspártico na posição 49

BLAST – *Basic Local Alignment search tool* ou Ferramenta de pesquisa de alinhamento local básico

CaCl₂ – cloreto de cálcio

CDNN – *Circular Dichroism analysis using Neural Networks* ou Análise de dicroísmo circular usando redes neurais

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CK – creatina quinase

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CoCl₂ – cloreto de cobalto

cPLA₂ – PLA₂ citosólica

CRD – domínio de reconhecimento de carboidrato

CTLD – domínios de lectina do tipo C

Ctx – crotoxina

DEAE – dietilaminoetil

DMPS - ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico

DO – densidade óptica

DTT – ditioneitol

eV – eletrônvolt

FX – Fator X

H₂O₂ – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HDMS^E – mobilidade iônica e análise independente de dados como forma de aquisição de MS

IAA – iodoacetamida

iPLA₂ – PLA₂ independente de cálcio

JF - jovens fêmeas

JM - jovens machos
KCl – cloreto de potássio
kDa – quilo daltons
KH₂PO₄ – fosfato de potássio monobásico
LAAO – L-aminoácido oxidase
LPLA₂ – PLA₂ lipossomal
Lys-49 – resíduo de aminoácido lisina na posição 49
M – molar
MS - *mass spectrometry* ou espectrometria de massa
m/z – razão massa sobre carga
mg – miligrama
Min – minutos
mM – milimolar
MPI – *myotoxin plasma inhibitor* ou inibidor de plasma de miotoxina
Na₂HPO₄ – fosfato de sódio dibásico
NaCl – cloreto de sódio
NanoESI-qTOF – nano *electrospray* – quadrupolo – tempo de vôo
NF - neonatos fêmeas
NM - neonatos machos
Nm – nanômetros
OMS – Organização Mundial de Saúde
PBS – tampão fosfato salino
PDA – arranjo de diodo
pH – potencial hidrogeniônico
pI – ponto isoelétrico
PLA₂ – *phospholipase A₂* ou fosfolipase A₂
PLI – *phospholipase A₂ plasma inhibitor* ou inibidor de plasma fosfolipase A₂
PVC - *polyvinyl chloride* ou policloreto de vinila
PVDF – difluoreto de polivinilideno
SDS-PAGE - eletroforese em gel de poliacrilamida contendo dodecil sulfato de sódio
SINAN – sistema de informação de agravos de notificações
sPLA₂ – PLA₂ secretória
SVMP – metaloprotease
SVSP – serinoprotease
TC – tempo de coagulação
TRIS – tris(hidroximetil)aminometano
TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada

UPLC – *ultra high performance liquid chromatography* ou cromatografia de ultra eficiência

UV-VIS – ultravioleta/luz visível

V – volts

VICC - *Venom-Induced Consumption Coagulopathy* ou Coagulopatia por Consumo Induzido por veneno

VC – volume de coluna

SÍMBOLO DOS AMINOÁCIDOS

Nome	Código de 3 letras	Código de 1 letra
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Aspartato	Asp	D
Cisteína	Cys	C
Glutamina	Gln	Q
Glutamato	Glu	E
Glicina	Gly	G
Histidina	His	H
Isoleucina	Iso	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Fenilalanina	Phe	F
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Tirosina	Tyr	Y
Valina	Val	V

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 – Filhote de <i>B. jararaca</i> com engodo caudal	24
Figura 2 – Adulto de <i>B. jararaca</i>	24
Figura 3 – Representação esquemática do protocolo experimental para imunização de camundongos usando γ BjPLI.....	43
Figura 4 – SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> das proteínas dos <i>pools</i> de plasma de <i>B. jararaca</i> reconhecidas pelo veneno de <i>B. jararaca</i>	60
Figura 5 – <i>Western blotting</i> de amostras individuais de proteínas do plasma de <i>B. jararaca</i> reconhecidas pelo veneno de <i>B. jararaca</i>	61
Figura 6 – Porcentagem de proteínas que foram retidas e eluídas da cromatografia de afinidade	62
Figura 7 – Perfil individual da resposta imune dos camundongos ao γ BjPLI e imunorreconhecimento da banda de 25 kDa do plasma de <i>B. jararaca</i> pelas proteínas do <i>pool</i> do soro de camundongos.....	63
Figura 8 – Dosagem de γ BjPLI por ELISA.....	64
Figura 9 – Abundância relativa das famílias de proteínas dos <i>pools</i> de plasmas de serpentes da espécie <i>B. jararaca</i> identificadas por espectrometria de massas.	67
Figura 10 – Alinhamento da sequência de aminoácidos dos PLI identificados.	70
Figura 11 – Abundância relativa das classes de PLIs presentes nos <i>pools</i> de plasmas de serpentes da espécie <i>B. jararaca</i> identificadas por espectrometria de massas.....	71
Figura 12 – Alinhamento da sequência de aminoácidos dos fatores anti-hemorrágicos identificados.	72
Figura 13 – Abundância relativa de proteínas descritas como fatores anti-hemorrágicos presentes nos <i>pools</i> de plasmas de serpentes da espécie <i>B. jararaca</i> identificadas por espectrometria de massas.	73
Figura 14 – Modelo do perfil tromboelastométrico adquirido durante um dos experimentos..	74
Figura 15 – Análise do tempo de coagulação.	74
Figura 16 – Inibição da atividade enzimática da PLA ₂ Lys-49 e da PLA ₂ Asp-49 pelo γ BjPLI.	75
Figura 17 – Espectro obtido por dicroísmo circular de γ BjPLI, e PLA ₂ Lys-49.....	76
Figura 18 – Espectro obtido por dicroísmo circular de γ BjPLI, e PLA ₂ Asp-49.	77
Figura 19 – Atividade inibitória do γ BjPLI sobre a atividade miotóxica provocada pelas PLA ₂ Asp-49 e Lys-49.	79
Figura 20 – Neutralização da atividade edematogênica causada pela PLA ₂ Lys-49 utilizando o γ BjPLI.	79
Figura 21 – Neutralização da atividade edematogênica causada pela PLA ₂ Asp-49 utilizando o γ BjPLI.	81
Figura 22 – Áreas sob a curva da neutralização da atividade edematogênica.....	82
Figura 23 – Sequência de nucleotídeos e aminoácidos referentes ao γ BjPLI.	83
Figura 24 – Amplificação do fragmento correspondente ao γ BjPLI. Análise por gel de agarose 1% do DNA amplificado por PCR.....	84

Figura 25 – Clonagem do pGEM-T <i>easy</i> + γ BjPLI em DH5 α	85
Figura 26 – Clonagem do pET28a+ γ BjPLI em DH5 α	86
Figura 27 – Análise de restrição.....	87
Figura 28 – Clonagem do pET28a+ γ BjPLI em <i>SHuffle</i>	88
Figura 29 – Sequência de aminoácidos correspondentes ao γ BjPLI recombinante.	88
Figura 30 – Expressão do γ BjPLI recombinante a partir dos clones positivos amplificados por PCR.....	89
Figura 31 – Solubilidade do γ BjPLI recombinante a partir dos clones positivos amplificados por PCR.....	90
Figura 32 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das PLA ₂	99

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 – Informações das amostras de neonatos, jovens e adultos da espécie <i>B. jararaca</i> .	39
Tabela 2 – Lista de proteínas identificadas por espectrometria de massas no plasma de serpentes da espécie.	66
Tabela 3 – Comparação da composição das estruturas secundárias adquiridas por dicroísmo circular.....	77
Tabela 4 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.....	82

SÚMARIO

1. Introdução	22
1.1. Acidente ofídico	22
1.2. <i>Bothrops jararaca</i>	23
1.3. Veneno	25
1.4. Fosfolipase	26
1.5. Tratamento	29
1.6. Inibidores naturais	31
1.7. Inibidores naturais de fosfolipase A ₂	33
1.8. γ BjPLI	34
2. Objetivos	37
2.1. Objetivos específicos	37
3. Materiais e Métodos	38
3.1. Animais	38
3.1.1. Camundongos	38
3.1.2. Serpentes	38
3.2. Venenos	40
3.3. Plasma	40
3.4. Dosagem de proteínas	40
3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)	40
3.6. <i>Western blotting</i>	41
3.7. Cromatografia de afinidade	41
3.8. Produção de anti- γ BjPLI e dosagem de γ BjPLI no plasma de <i>B. jararaca</i>	42
3.8.3. <i>Western blotting</i>	44
3.9. Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)	44
3.9.1. Digestão em solução das amostras	44
3.9.2. Análise das amostras digeridas por espectrometria de massas	45
3.9.3. Identificação de proteínas por busca em banco de dados	46
3.10. Obtenção das amostras isoladas de PLA ₂ e γ BjPLI	46
3.11. Tromboelastometria	47
3.12. Dicroísmo circular	48
3.13. Atividade enzimática	49

3.14. Atividade miotóxica _____	49
3.15. Avaliação do edema de pata _____	50
3.16. Clonagem do γ BjPLI _____	51
3.16.1. Amplificação do gene _____	51
3.16.2. Purificação dos produtos amplificados por PCR _____	52
3.16.3. Clonagem dos produtos de PCR o vetor de clonagem pGEM-T easy – Reação de ligação _____	52
3.16.4. Transformação da bactéria <i>E coli</i> DH5 α com o plasmídeo recombinante pGEM-T easy _____	52
3.16.5. Confirmação de colônias positivas e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pGEM-T easy de <i>E. coli</i> DH5 α _____	53
3.16.6. Clonagem dos genes no plasmídeo de expressão pET28a _____	54
3.16.7. Transformação da bactéria <i>E coli</i> DH5 α com o plasmídeo recombinante pET28a _____	55
3.16.8. Confirmação de colônias positivas e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pET28a de <i>E. coli</i> DH5 α _____	56
3.16.9. Transformação da cepa <i>SHuffle</i> de <i>E. coli</i> com o plasmídeo recombinante pET28a+ γ BjPLI _____	57
3.17. Expressão heteróloga da proteína recombinante _____	57
3.18. Análise de solubilidade _____	58
4. Resultados _____	59
4.1. SDS-PAGE e <i>Western blotting</i> _____	59
4.2. Cromatografia de afinidade _____	61
4.3. Quantificação de γ BjPLI no plasma _____	62
4.4. Análise proteômica do plasma por espectrometria de massas _____	65
4.5. Análise da inibição da atividade anticoagulante da crotoxina _____	73
4.6. Inibição da atividade enzimática _____	75
4.7. Estruturas secundárias _____	75
4.8. Inibição da atividade miotóxica _____	78
4.9. Inibição da atividade edematogênica _____	79
4.10. Clonagem e expressão _____	82
5. Discussão _____	91
6. Conclusões _____	104
Referências _____	105

1. Introdução

1.1. Acidente ofídico

As serpentes são um grupo de animais que há muito tempo desperta o interesse humano, devido à sua influência na psicologia humana advinda de histórias passadas por gerações em diversas culturas. No entanto, além do interesse cultural, essas serpentes possuem significativa importância ecológica, sendo um grupo com importante participação na cadeia alimentar, bem como de importância na saúde pública, uma vez que são responsáveis pelos acidentes ofídicos. Além disso, suas toxinas presentes no veneno também têm sido fonte de moléculas com potencial biotecnológico (CHIPPAUX, 2017; FITA; NETO; SCHIAVETTI, 2010; GOLDSTEIN et al., 2021; LANDOVÁ et al., 2018; LI; HUANG; LIN, 2018; PEREIRA et al., 2020).

Atualmente, já foram descritas 3.848 espécies de serpentes (dados retirados de www.reptile-database.org), das quais aproximadamente 278 são serpentes peçonhentas de importância médica e responsáveis pelos acidentes ofídicos mais graves (SCHNEIDER et al., 2021; TASOULIS; ISBISTER, 2017). Os acidentes ofídicos são considerados um importante agravo à saúde, tanto no Brasil quanto em outras partes do mundo, sendo as áreas tropicais e subtropicais da África, Ásia, América Latina e Oceania as mais afetadas (GUTIÉRREZ et al., 2007).

Dados epidemiológicos demonstram que, mundialmente, ocorrem cerca de 5 milhões de acidentes ofídicos, com 2,5 milhões de envenenamentos por ano, dos quais, 400 mil resultam em amputações e 94-125 mil resultam em mortes (CHIPPAUX, 1998; WORLD HEALTH ORGANIZATION ORGANIZATION, 2007). Com relação ao Brasil, a média de acidentes é de 24 mil por ano. De acordo com as notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação (Sinan Net), nos primeiros 6 meses de 2021, os acidentes com espécies do gênero *Bothrops* foram os de maior frequência, com 86% (3902 casos), seguidos pelos gêneros *Crotalus* com 12% (553 casos), *Lachesis* com 1% (47 casos) e *Micrurus* com 1% (40 casos), lembrando que estes números podem estar defasados devido à subnotificação dos casos ao órgão competente (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

A maior parte dos afetados por acidentes com serpentes peçonhentas são homens de baixa renda que moram em zonas rurais e/ou trabalham com agricultura, e, devido ao alto número de mortes nessas populações, o envenenamento por serpentes tem sido muito associado

à pobreza. Por isso, em abril de 2009, a Organização Mundial da Saúde (OMS) introduziu os acidentes ofídicos na lista de doenças tropicais negligenciadas (*neglected tropical diseases*; NTDs), o que influenciou na criação de uma série de metas para promover a prevenção, a redução e o controle do número de acidentes em 50% até 2030 (CHIPPAUX, 2017; CLARE et al., 2021; HARRISON et al., 2009; WILLIAMS et al., 2019).

1.2. *Bothrops jararaca*

O gênero *Bothrops*, principal responsável por acidentes ofídicos no Brasil, pertence à família Viperidae e possui cerca de 26 espécies no território brasileiro, entre elas as espécies *B. alternatus*, *B. atrox*, *B. erythromelas*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi* e a mais conhecida *B. jararaca* (MELGAREJO, 2009).

De um modo geral, sabe-se que a espécie *B. jararaca* (**Figura 1 e 2**) possui características morfológicas variadas, capacidade de adaptação a diferentes habitats, e grande abrangência territorial. Os espécimes possuem coloração críptica, com tons que vão desde o castanho claro até o preto, que os ajudam a se camuflar no ambiente. Possuem cerca de 1 metro de comprimento, sendo possível encontrar indivíduos de até 1,6 metro de comprimento (CAMPBELL, JONATHAN A.LAMAR, 2004). Além disso, são animais extremamente ágeis e ativos, sobretudo no período crepuscular. Possui ciclo reprodutivo típico, no qual as proles nascem entre fevereiro e março, sendo as ninhadas em média compostas de 14 espécimes (BRENO, 1990).

Figura 1 – Filhote de *B. jararaca* com engodo caudal (foto: Sávio Stefanini Sant’Anna).



Figura 2 – Adulto de *B. jararaca* (foto: Sávio Stefanini Sant’Anna).



O acidente ofídico causado por espécies do gênero *Bothrops* possui ação proteolítica, coagulante e hemorrágica marcantes, que são efeitos tóxicos causados por diversas proteínas e peptídeos presentes no veneno. Estas ações são responsáveis pelas manifestações sistêmicas, como sangramento em ferimentos cutâneos preexistentes e hemorragias distantes do local da picada (gengivorragias, epistaxes, hematêmese e hematúria). Ademais, também são responsáveis pelas intensas manifestações inflamatórias locais, como a dor, hemorragia, edema e mionecrose (BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNASA., 2001; CURY; TEIXEIRA;

SUDO, 1994; GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 1989; TEIXEIRA et al., 2009, 1994).

Essas atividades são extremamente complexas e podem, usualmente, ser atribuídas a alguns componentes específicos. No entanto, diferentes toxinas podem atuar sinergicamente e uma única toxina pode apresentar diversas atividades (FRANÇA; MÁLAQUE, 2009). Dependendo da gravidade do caso e do tratamento atribuído ao acidentado, os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* podem levar à amputação de membros e à morte (CARDOSO et al., 2009).

1.3. Veneno

Os diferentes efeitos fisiopatológicos do envenenamento ocorrem devido aos compostos presentes no veneno. Segundo alguns autores, o peso seco dos venenos é constituído por cerca de 90% de proteínas, porém, apesar de apresentarem mais de 250 proteínas distintas (NICOLAU et al., 2016; SERRANO et al., 2005; SOUSA et al., 2001), são representadas por poucas famílias proteicas clássicas, incluindo proteínas com atividade enzimática (serinoproteases, metaloproteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases) e sem atividade enzimática (disintegrinas, lectinas, peptídeos natriuréticos, miotoxinas, proteínas secretadas ricas em cisteínas, fatores de crescimento neural e endotelial, cistatinas e inibidores de proteases do tipo Kunitz) (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007; FRY, 2005; JUÁREZ; SANZ; CALVETE, 2004; MARKLAND, 1998; SERRANO et al., 2005). Por outro lado, os outros 10% do peso seco têm sido atribuídos às frações não proteicas, que são representadas por carboidratos, lipídeos, metais (frequentemente associados à glicoproteínas e metaloproteases), aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos livres (VARANDA; GIANNINI, 1994).

A composição de cada um dos compostos proteicos citados anteriormente é variável e pode estar relacionada a diversos fatores, tais como a filogenia, a idade, o sexo, a distribuição geográfica e a dieta das serpentes (CALVETE et al., 2011; GIBBS; MACKESSY, 2009; GUÉRCIO et al., 2006; MENEZES et al., 2006; SALDARRIAGA et al., 2003; SUNTRAVAT; NUCHPRAYOON; PÉREZ, 2010; TU, 1977, 1991).

Em 1999, Andrade e Abe descreveram na espécie *B. jararaca* mudanças ontogenéticas relacionados a dieta, nas quais os venenos de serpentes adultas foram mais letais para camundongos, enquanto os dos juvenis foram mais letais para sapos. Esses resultados sugerem

que a toxicidade do veneno reflète a variação alimentar das serpentes, pois os juvenis tendem a se alimentar de animais ectotérmicos, e os adultos de animais endotérmicos, sendo, portanto, mais letais para o grupo de maior frequência alimentar (MARTINS; MARQUES; SAZIMA, 2002; ZELANIS et al., 2010).

Neste contexto, Zelanis e colaboradores (2010) analisaram o proteoma dos venenos de filhotes e adultos de *B. jararaca*, revelando a existência de diferentes perfis proteicos entre os dois grupos, reiterando as toxicidades distintas entre os venenos testados. Nesse trabalho, foi demonstrado que, embora a atividade hemorrágica seja similar em ambos os grupos, os venenos dos filhotes possuem maior capacidade pró-coagulante, além de serem mais rápidos e eficientes na ativação de fatores II e X da cascata de coagulação sanguínea, enquanto os venenos dos adultos apresentaram maior atividade proteolítica. Estas diferenças estão relacionadas principalmente às diferentes metaloproteases encontradas em cada grupo, sendo que as metaloproteases da classe PI são encontradas em maior abundância no veneno dos adultos e as metaloproteases da classe PIII encontram-se em maior abundância no veneno dos filhotes, juntamente com a maior expressão de serinoproteases, precursores de peptídeos potenciadores de bradicinina e lectinas tipo-C.

1.4. Fosfolipases

As fosfolipases são uma superfamília de enzimas responsáveis pela clivagem dos fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídios. Existem diferentes classes de fosfolipases, que são classificadas de acordo com a posição do sítio de hidrólise na cadeia carbônica dos fosfolipídios, podendo ser classificadas em: A₁, A₂, B, C e D (VAN DEENEN; DE HAAS, 1963).

As PLA₂ (EC: 3.1.1.44) são capazes de hidrolisar a ligação éster do carbono sn-2 dos fosfolipídios. De acordo com suas características físico-químicas, as PLA₂ podem ser classificadas em quinze grupos (I – XV) divididos em seis famílias: as fosfolipases A₂ secretadas (sPLA₂s), as fosfolipases A₂ citosólicas (cPLA₂s), as fosfolipases A₂ Ca²⁺-independentes (iPLA₂s), os fatores de ativação plaquetária do tipo acetilhidrolases (PAF-AH), as fosfolipases A₂ lisossomais (LyPLA₂s) e as fosfolipases A₂ adiposas (BURKE; DENNIS, 2009; CUMMINGS; MCHOWAT; SCHNELLMANN, 2000).

As sPLA₂ possuem 11 diferentes isoformas e foram as primeiras a serem descritas dentre as PLA₂, sendo que sua descoberta ocorreu devido à observação de sua ação no suco pancreático de mamíferos e na peçonha de serpentes e insetos, na hidrólise de fosfatidilcolina. Estas proteínas possuem uma reação dependente de cálcio e no mínimo seis pontes dissulfetos altamente conservadas (DENNIS et al., 1991; SANTOS-FILHO, 2009). A substituição do íon cálcio pode ocorrer, porém a substituição dele por outros íons bivalentes, como o bário e o cádmio, reduzem de forma significativa a atividade enzimática (YU; BERG; JAIN, 1993).

As PLA₂ dos venenos das famílias Elapidae e Viperidae pertencem, respectivamente, aos grupos IA e IIA/IIB. Sendo que, as da família Elapidae possuem características estruturais similares a de PLA₂ pancreáticas de mamíferos, enquanto as PLA₂ da família Viperidae possuem características estruturais similares a de PLA₂ sinoviais de mamíferos. Segundo Lomonte e colaboradores (2011), isso pode ter ocorrido devido a uma evolução convergente, no qual o recrutamento de proteínas, para obter uma função tóxica na glândula de veneno, ocorreu após a diferenciação das características conformacionais que distinguem os grupos I e II (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; NAKASHIMA et al., 1995).

Em geral, as PLA₂ de venenos de serpentes possuem massa molecular de 13 a 15 kDa, cerca de 120 resíduos de aminoácidos e sua estrutura é estabilizada por 7 a 8 pontes dissulfeto. Possuem três subunidades α -hélices e duas folhas β anti-paralelas, uma alça de ligação ao cálcio (XCGXGG) e um sítio catalítico (DDXCCXXHD), podem ser monoméricas, homodiméricas e heterodiméricas complexadas (ARNI; WARD, 1996).

Além da diferença na posição de uma das pontes dissulfetos (presente entre Cys11-Cys77 no grupo I e entre Cys51-Cys77 no grupo II), inserção de dois ou três aminoácidos entre as posições 52 e 65 (denominado alça elapídica) no grupo I, e uma extensão de cinco a sete aminoácidos no grupo II, as PLA₂ do grupo II podem ser classificadas em subgrupos de acordo com o aminoácido presente na posição 49. A substituição do aminoácido Asp ocorre com mais frequência por Lys na posição 49, no entanto, também pode ocorrer a substituição por Ser, Arg, Gln ou Asn. Sendo assim, os subgrupos mais comuns encontrados na literatura são denominados PLA₂ Asp-49 e PLA₂ Lys-49 (DOS SANTOS et al., 2009; LOMONTE; ANGULO; CALDERÓN, 2003; SCOTT et al., 1992; WARD et al., 2002).

A presença do aminoácido Asp na posição 49 é essencial para que a atividade catalítica da enzima seja mantida, já que Asp-49 junto com Tyr28, Gly30 e Gly32 são os aminoácidos

responsáveis pela manutenção da conformação estrutural. Esta conformação permite a ligação do íon cálcio, como cofator, para polarizar a ligação com a molécula de água e então atacar um radical carbonila presente nos fosfolipídios (SCOTT et al., 2010).

Apesar da ausência ou redução da atividade enzimática, devido a essa substituição de aminoácido Asp-49, as PLA₂ Lys-49 ainda são capazes de provocar outras ações durante o envenenamento por mecanismos independentes de atividade catalítica. Alguns autores sugerem que resíduos de aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos na região C terminal (115-129) presentes nas PLA₂ são os responsáveis por manterem essas outras atividade (ARAYA et al., 2007; LOMONTE; ANGULO; MORENO, 2010; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Além disso, o sinergismo das isoformas PLA₂ Asp-49 e PLA₂ Lys-49 tem sido apontado como responsável pela atividade miotóxica dos venenos das serpentes (BUSTILLO et al., 2019; MORA-OBANDO et al., 2014).

Dentre os efeitos fisiopatológicos atribuídos às PLA₂ de venenos de serpentes estão os danos locais, como o efeito pró-inflamatório e miotóxico, além de danos sistêmicos, como atividade hemolítica, citotóxica, hipotensiva, anticoagulante e atividade inibitória ou de ativação da agregação plaquetária, bem como efeitos neurotóxicos pré-sinápticos. Isso se deve à diversidade de conformações estruturais e a não dependência da atividade enzimática para todas as suas ações, proporcionadas por sítos farmacológicos distintos dos sítios de clivagem presentes na superfície das PLA₂ (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013; KINI; EVANS, 1989).

Sabe-se que os efeitos locais são os mais difíceis de serem neutralizados, podendo resultar em sérias sequelas. O dano muscular, por exemplo, pode ser ocasionado pelas (1) PLA₂ Asp-49 monoméricas ou homodiméricas, (2) Asp-49 heterodiméricas complexadas e/ou as (3) Lys-49 monoméricas ou homodiméricas (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013). As PLA₂ danificam a integridade da membrana plasmática, através da atividade catalítica e/ou por penetração e desorganização da bicamada lipídica, utilizando um mecanismo independente de atividade catalítica. Após o rompimento da membrana plasmática ocorre um influxo de cálcio que promove uma série de efeitos degenerativos (GUTIÉRREZ et al., 2018; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

Na inflamação, as PLA₂ são responsáveis principalmente pelo aumento dos níveis de ácido araquidônico, que é o principal substrato para biossíntese de diversos mediadores lipídicos (por exemplo, prostaglandinas, leucotrienos e fatores de agregação plaquetária) que,

por sua vez, desencadeiam os processos inflamatórios (PARENTE, 2001). Estes mediadores são vasodilatadores, tanto isolados, quanto em sinergia com histamina e bradicinina, aumentando o rubor e o fluxo sanguíneo nas áreas afetadas. Além disso, eles aumentam a permeabilidade vascular da bradicinina e da histamina, contribuindo assim para a exsudação plasmática e formação do edema, aumentam a dor, sensibilizando fibras C aferentes e a temperatura corporal, ao atuarem sobre neurônios na região termorreguladora do hipotálamo (PARENTE, 2001).

Além do papel na inflamação, as PLA₂ de venenos de serpentes também tem sido descrita como tendo papel importante no desencadeamento de coagulopatias, que é um quadro clínico sistêmico importante causado pelo envenenamento por serpentes em todo o mundo. Estas coagulopatias são ocasionadas por distúrbios na hemostasia, provocados por proteínas que podem ativar ou inibir fatores da coagulação sanguínea ou fibrinólise, como por exemplo, ativação do fator V, ativação/inibição do fator X, ativação da protrombina, inibição da trombina, atividade fibrinogenolítica, ativação do plasminogênio, e por fim, capacidade de inibir a agregação plaquetária (MADUWAGE; ISBISTER, 2014; SLAGBOOM et al., 2017).

1.5. Tratamento

Atualmente, o único tratamento eficaz indicado para acidentes ofídicos é a soro terapia antiveneno, cuja produção envolve a injeção de doses subletais de um *pool* de venenos em animais de grande porte, como por exemplo, cavalos. Dependendo da metodologia, estes antivenenos podem ser compostos por moléculas de IgG inteiras, o que prejudica a permeabilidade e o acesso dessas moléculas ao local da picada, ou apenas dos fragmentos F(ab')₂ (BERMÚDEZ-MÉNDEZ et al., 2018; LALLOO; THEAKSTON, 2003).

O uso destes antivenenos tem sido muito eficaz na neutralização dos efeitos sistêmicos provocados pelos venenos de serpentes. Entretanto, o maior desafio tem sido produzir antivenenos que consigam neutralizar o veneno de um maior número de espécies, já que os venenos possuem uma grande variabilidade intraespecífica e interespecífica em sua composição proteica. Além disso, os danos teciduais locais também não são bem neutralizados pela terapia convencional, podendo resultar na perda permanente de tecido e amputação. Isso ocorre, principalmente, por causa da rápida ação de algumas proteínas, o que torna-se ainda mais problemático, sobretudo, quando os acidentes ofídicos ocorrem em região de difícil acesso do país, onde o tempo até a administração do antiveneno é prolongado e necessita de uma equipe

especializada em administração intravenosa (CARDOSO et al., 1993; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; KOUASSI et al., 2017; PIERINI et al., 1996).

Outro ponto negativo sobre a terapia com antiveneno é o seu alto custo, pois, estima-se que em alguns países a produção de uma única dose possa custar até US \$ 315. Tal custo torna o tratamento para aquelas populações que vivem em países subdesenvolvidos quase inacessível, principalmente porque, na maioria das vezes, o tratamento exige o uso de várias doses de antiveneno (HARRISON et al., 2017; LALLOO; THEAKSTON, 2003).

Neste contexto, a busca por moléculas bioativas que auxiliem no tratamento do envenenamento ofídico tem sido bastante incentivada pela comunidade científica global. O principal foco nos estudos tem sido as moléculas que inibem metaloproteases e PLA₂, as quais são proteínas encontradas abundantemente em diversas espécies de serpentes e possuem importante papel no efeito tóxico do veneno. Além disso, para que moléculas sejam consideradas interessantes para o estudo, elas devem ser capazes de inibir com eficácia mais de uma isoforma da toxina, possuir alta meia-vida e estabilidade, tamanhos reduzidos (para que possam penetrar facilmente no tecido), além de ter um custo de fabricação reduzido. Neste quesito, existem poucas drogas candidatas que contenham essas características e que estejam em fases mais avançadas do estudo para serem usadas no tratamento de acidentes ofídicos, dentre elas estão DMPS (ácido 2,3-dimercapto-1-propanosulfônico), batimastat, marimastat como inibidores de metaloproteases e varespladib e suramin como inibidores de PLA₂ (ALBULESCU et al., 2020; CLARE et al., 2021; HARRISON et al., 2017; LEWIN et al., 2016).

O varespladib (LY315920) é um composto sintético derivado do methyl-varespladib (LY333013), sendo que ambos foram projetados para a inibição de PLA₂ humanas que estão relacionadas a algumas doenças, como a artrite reumatoide, sepsis e doenças cardiovasculares. No entanto, o uso do varespladib para este propósito foi abandonado nas fases de testes clínicos II e III, devido à falta de eficácia. Porém, como também tem sido descrita a capacidade inibitória do varespladib sobre a PLA₂ de diferentes venenos de serpentes, *in vivo* e *in vitro*, o uso dessa molécula tem sido reaproveitado para o tratamento de acidentes ofídicos (ALBULESCU et al., 2021, 2020; XIE et al., 2020). O suramin também é um composto sintético, que inicialmente foi testado para ser utilizado no tratamento de doenças parasitárias, mas atualmente tem surgido alguns trabalhos que mostram a sua atividade na inibição de PLA₂ de venenos de serpentes, principalmente na inibição do efeito miotóxico e do bloqueio neuromuscular induzido por PLA₂

com ação pré-sináptica (ALBULESCU et al., 2021; MURAKAMI et al., 2005; SALVADOR et al., 2018).

1.6. Inibidores naturais

Os inibidores naturais de venenos de serpentes também estão sendo estudados há mais de um século, desde que Fontana descreveu em seu trabalho uma resistência natural que impede o envenenamento de serpentes pelo veneno de sua própria espécie (FONTANA, 1781). Com o surgimento de novos estudos a respeito desses inibidores, foi descoberto também uma resistência natural contra a ação do veneno de serpentes em outras serpentes peçonhentas e não peçonhentas, bem como em mamíferos, como o ouriço pigmeu africano (*Erinaceus europaeus*) e gambás (*Didelphis marsupialis*) (DE WIT; WESTRÖM, 1987; GIMENES et al., 2014; MENCHACA; PEREZ, 1981; OHKURA et al., 1997; OKUMURA et al., 1999a; OMORI-SATOH; YAMAKAWA; MEBS, 2000; TOMIHARA et al., 1987).

Evidências experimentais indicam que a resistência aos venenos de serpentes encontrada em mamíferos de hábito ofiófago e em serpentes deve-se à presença de proteínas plasmáticas que são capazes de inibir componentes tóxicos do veneno, devido à pressão coevolutiva presa-predador ou pela proteção contra o autoenvenenamento (ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017; BASTOS et al., 2016; DE WIT; WESTRÖM, 1987; GIBBS et al., 2020; JOSEPH et al., 2002; PERALES et al., 1995; THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; VIEIRA et al., 2008). Além disso, o surgimento de proteínas com essas características pode estar relacionado com os processos de duplicação ou renovação de genes, a neofuncionalização, ou com a aquisição de imunidade (HOLDING et al., 2016).

As principais proteínas plasmáticas com capacidade de neutralização do veneno são os inibidores de metaloproteases (fatores anti-hemorrágicos), os inibidores de PLA₂ (PLIs) (fatores anti-neurotóxicos e anti-miotóxicos) e inibidores de lectinas tipo C (CAMPOS et al., 2016; FORTES-DIAS, 2002; FOX, J. W.; BJARNASON, 1998; GIBBS et al., 2020; HOLDING et al., 2016; PERALES et al., 1995; PÉREZ; SÁNCHEZ, 1999; TANAKA-AZEVEDO; TANAKA; SANO-MARTINS, 2003).

Alguns desses inibidores já foram identificados, purificados e caracterizados a partir do sangue da serpente *B. jararaca*. Entre eles estão o Bj46a e o Bj46b (isoforma menos abundante),

os quais possuem massa molecular de 46 kDa e capacidade de inibir a atividade hemorrágica causada por atrolisina C e jararagina, duas metaloproteases (classe P-I e classe P-III, respectivamente) de *B. jararaca* (VALENTE et al., 2001). Também foi isolado um inibidor da trombina, o BjI, uma proteína com duas sequências polipeptídicas de 109 e 139 kDa e massa molecular nativa superior a 1000 kDa, a qual reconhece enzimas semelhantes à trombina (serinoproteases) do veneno da *B. jararaca* (DE MORAIS-ZANI et al., 2013; TANAKA-AZEVEDO; TANAKA; SANO-MARTINS, 2003).

O fibrinogênio de *B. jararaca*, com massa molecular total de 372 kDa, e três cadeias de 71, 60 e 55 kDa, apresentou resistência à coagulação por venenos de serpentes das espécies *B. jararaca*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta rhombeata*, e por essa razão também tem sido descrito como possível fator protetor contra o autoenvenenamento (VIEIRA et al., 2008). Além disso, recentemente, nosso grupo isolou um PLI a partir do plasma da serpente *B. jararaca*, denominado de γ BjPLI, proteína com massa molecular de 22 kDa e capacidade de inibir as atividades enzimática, edematogênica e mionecrótica da PLA₂ de *C. d. terrificus* (SERINO-SILVA et al., 2018).

Embora vários estudos descrevam diferenças ontogenéticas na composição dos venenos de serpentes, estudos que relacionam essas diferenças do veneno à composição e ontogenia das proteínas plasmáticas ainda são escassos (ALAPE-GIRON et al., 2008; ANDRADE DENIS V.; ABE, 1999; DURBAN et al., 2013; MACHADO BRAGA et al., 2020; SALDARRIAGA et al., 2003; SANTORO et al., 2015; ZELANIS et al., 2010). De fato, na literatura, que seja de nosso conhecimento, existem apenas dois trabalhos publicados pelo nosso grupo que abordam a ontogenia da composição do plasma da *B. jararaca*. Gomes e colaboradores (2017) realizaram a análise comparativa da variação ontogenética da expressão de perfis de transcritos de proteínas plasmáticas com potencial atividade antiveneno de serpentes juvenis e adultas de *B. jararaca*. Nessa análise transcriptômica foi encontrado o inibidor Bj46a, que não apresentou diferença ontogenética, além de uma isoforma de PLI e dois inibidores de protease (inibidor inter-alfa-tripsina e inibidor C1), os quais apresentaram maior expressão no grupo adulto (GOMES et al., 2017). Além disso, no estudo de Moraes-Zani e colaboradores (2013) foi descrito em uma análise proteômica do plasma de *B. jararaca* que os inibidores Bj46a e PLI possuem variação ontogenética, sendo que a quantidade de Bj46a é maior em adultos enquanto a do PLI é maior em espécimes juvenis.

1.7. Inibidores naturais de fosfolipase A₂

Os PLIs são inibidores naturais sintetizados no fígado de serpentes peçonhentas e não peçonhentas, o que sugere que estes inibidores podem exercer outras funções, além do papel protetivo (ESTEVÃO-COSTA et al., 2016). Em geral, possuem massas moleculares nativas de 75 a 180 kDa e são formados por 3-6 subunidades idênticas ou diferentes de 20 a 50 kDa (algumas glicosiladas), ligadas não covalentemente. Com base na homologia na sequência de aminoácidos, os PLIs são classificados em três diferentes classes (α PLI, β PLI e γ PLI) (OHKURA et al., 1997).

α PLI – são proteínas globulares compostas por subunidades de 18-25 kDa com 147 aminoácidos e um sítio de N-glicosilação. Também possuem similaridade sequencial com o domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) das lectinas tipo-C, que pode estar relacionado à atividade de neutralização das PLA₂ (LIZANO et al., 1997; OHKURA et al., 1993; Z. OLIVEIRA et al., 2011).

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

γ PLI – são os inibidores que apresentam o maior número de subunidades proteicas, com massa molecular de 90 a 130 kDa, compostas por 3-6 subunidades de 20-31 kDa, unidas por ligações não covalentes. Esta classe de inibidores é a mais comumente encontrada no plasma das serpentes. Sua principal característica estrutural é a repetição comum intermolecular de domínios ricos em cisteína, conhecidos como motivos *three-finger*, tais como os encontrados em proteínas pertencentes à família Ly-6, do ativador de plasminogênio tipo uroquinase, e em α -neurotoxinas (OHKURA et al., 1994).

A classe de inibidores do tipo γ foi subdividida em I e II, de acordo com sua composição, podendo ser hetero-oligoméricas ou homo-oligoméricas, respectivamente (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Outro dado importante que sustenta a divisão de subclasses desses inibidores é que os γ PLIs I possuem a capacidade de inibir todas as classes de PLA₂ de

venenos (I, II e III), enquanto as γ PLIs II inibem apenas as PLA₂ da classe II (FORTES-DIAS et al., 1994). Estevão-Costa (2008), usando transcriptoma, traçou a filogenia de γ PLI das espécies *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. Essas espécies, que são comumente encontradas no Brasil, apresentaram grande similaridade na estrutura primária e secundária. Neste mesmo trabalho, o oligopeptídeo ¹⁰⁴QPFPGGLPLSRPNGYY¹¹⁸ foi identificado em todas as sequências estruturais das espécies do gênero *Bothrops*, sendo considerado o responsável pela interação com as PLA₂, já que é similar ao decapeptídeo ¹⁰⁷PGLPLSLQNG¹¹⁶, capaz de inibir PLA₂ dos grupos I-III, além de PLA₂ sinoviais humanas (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008; THWIN et al., 2000).

Kinkawa e colaboradores (2010) demonstraram que a expressão gênica de α PLI e β PLI no fígado de *Gloydus brevicaudus* é regulada através de indutores presentes no veneno destes animais. Nesse trabalho, o grupo administrou PLA₂ proveniente do próprio veneno, via intramuscular, na serpente, e observou o aumento da expressão desses inibidores no soro desses animais. É interessante notar que, além da identificação de γ PLI no sangue de animais, também tem sido identificada a presença destes inibidores no veneno de serpentes, (DA SILVA AGUIAR et al., 2019; LIZANO et al., 2000).

1.8. γ BjPLI

Embora PLIs já tenham sido descritos e purificados em soros de algumas espécies de serpentes (GIMENES et al., 2014; OHKURA et al., 1993, 1997; OKUMURA et al., 1999a; Z. OLIVEIRA et al., 2011), a presença da PLI na serpente *B. jararaca* só havia sido relatada por Estevão-Costa (2008) através da transcrição de cDNA de células do fígado. Porém, recentemente, como mencionado no item 1.6, o nosso grupo isolou um inibidor de PLA₂ do tipo gama, denominado de γ BjPLI a partir do soro de *B. jararaca* (SERINO-SILVA et al., 2018). O γ BjPLI apresentou alta semelhança com o PLI descrito por Estevão-Costa (2008). O γ BjPLI também apresenta o oligopeptídeo ¹⁰⁴QPFPGGLPLSRPNGYY¹¹⁸, descrito como capaz de inibir PLA₂. Além disso, foi descrito a formação de um complexo não-covalente entre o γ BjPLI e a PLA₂, e sua capacidade de inibir a atividade enzimática, edematogênica e mionecrótica da PLA₂-Asp49 de *Crotalus durissus terrificus* (SERINO-SILVA et al., 2018).

A obtenção de PLIs para estudos tem sido feita principalmente através do processamento do sangue, plasma ou soro por técnicas de purificação. Porém, em virtude da baixa quantidade desses inibidores no sangue desses animais, esse tipo de metodologia tem sido responsável por

uma baixa recuperação dessas proteínas, tornando-se uma barreira para a produção de futuros biofármacos (SOARES; ZULIANI, 2019).

Através de cromatografias de troca iônica e de afinidade, a quantidade do inibidor γ BjPLI isolada representa 1% em relação ao total de proteína inicial, enquanto o γ CdcPLI de *Crotalus durissus collilineatus* representa 2,69% e o Boa γ PLI de *Boa constrictor* representa 0,63%. Além das diferenças metodológicas, o baixo rendimento pode ocorrer devido à baixa concentração desses inibidores presentes no sangue desses animais (BITTENCOURT RODRIGUES et al., 2020; GIMENES et al., 2014; SERINO-SILVA et al., 2018).

Sendo assim, a produção de proteínas na forma recombinante tem sido uma das alternativas para a obtenção de maiores quantidades desses inibidores. Atualmente, já foi descrita a expressão de PLIs recombinantes de quatro espécies de serpentes. O primeiro inibidor recombinante expresso foi o α PLI das serpentes *Agkistrodon blomhoffi siniticus*, no ano de 1999, seguido pelo α PLI de *B. alternatus* em 2014, e o γ PLI das serpentes *Sinonatrix annularis* e *Crotalus durissus collilineatus*, em 2015 e 2020, respectivamente (GIMENES et al., 2020; LE et al., 2015; OKUMURA et al., 1999b; SANTOS-FILHO et al., 2014). Além disso, foi descrita a expressão de uma proteína quimérica, também da classe γ dos PLIs, feita a partir das sequências encontradas em serpentes das espécies *Sinonatrix annularis* e *Elaphe carinata* (SUN et al., 2018).

Embora os α PLI e γ PLI sejam proteínas glicosiladas, estes açúcares não são importantes para a atividade inibitória dessas proteínas (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008, 2016; GIMENES et al., 2014; NOBUHISA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; SOARES et al., 2003). Por isso, com a exceção da expressão do α PLI de *B. alternatus*, que foi expresso utilizando um sistema eucariótico em cepa de levedura da espécie *Pichia pastoris*, os demais inibidores foram expressos em sistema procarionte, utilizando-se diferentes cepas de *Escherichia coli* (GIMENES et al., 2020; LE et al., 2015; OKUMURA et al., 1999b; SANTOS-FILHO et al., 2014). No entanto, embora todos os artigos demonstrem sucesso na expressão dessas proteínas e com exceção da proteína quimérica, a atividade inibitória desses PLIs recombinantes foi menor do que suas versões naturais (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008, 2016; GIMENES et al., 2014; NOBUHISA et al., 1998; OLIVEIRA et al., 2008; SOARES et al., 2003; SUN et al., 2018).

Embora Gimenes e colaboradores (2020), após análise por dicroísmo circular, tenham descrito que os espectros do inibidor nativo e do recombinante são similares, também descrevem pequenas alterações nas composições das estruturas secundárias, o que pode ser reflexo de erros no dobramento dessas proteínas recombinantes durante a expressão, além de estarem relacionados com a diminuição da atividade inibitória.

Levando isso em consideração, é de grande importância a busca por cepas de bactérias alternativas, que possam auxiliar na expressão dessas proteínas, mantendo o alto rendimento final e a estrutura natural, para que a atividade também seja mantida.

Sendo assim, as diferenças ontogenéticas relatadas nos venenos das serpentes motivou-nos a estudar a ontogenia da composição de proteínas inibidoras do veneno de serpentes, com ênfase em PLIs, do plasma de neonatos, jovens e adultos da serpente *B. jararaca* (ANDRADE DENIS V.; ABE, 1999; ZELANIS, 2011; ZELANIS et al., 2012b). Além disso, devido à importância da obtenção de novas moléculas que possam vir a auxiliar a neutralização do efeito local do envenenamento, de forma conjunta com o antiveneno, também decidimos estudar a inibição de atividade de duas PLA₂ (PLA₂-Asp49 e PLA₂-Lys49), exercida pelo γ BjPLI, bem como a produção do γ BjPLI recombinante usando a cepa *SHuffle* de *Escherichia coli*. Essa cepa possui a capacidade de produzir grandes quantidades de proteínas com pontes dissulfeto em seu citoplasma, o que auxiliaria na formação das estruturas secundárias do γ BjPLI, derivadas das suas sete pontes dissulfeto, melhorando o rendimento da obtenção deste inibidor (LOBSTEIN et al., 2016; SERINO-SILVA et al., 2018).

2. Objetivos

O presente trabalho tem como objetivo estudar de forma comparativa a composição de proteínas inibidoras do veneno de serpentes, com ênfase em PLIs, do plasma de neonatos, jovens e adultos da serpente *B. jararaca*. Visa também avaliar a capacidade neutralizante do γ BjPLI, isolado do soro da serpente *B. jararaca*, sobre as atividades da PLA₂ (Asp-49 e Lys-49), bem como analisar a relação estrutura/função da molécula alvo. Além disso, pretende-se clonar e expressar a forma recombinante o γ BjPLI em busca da obtenção de maiores quantidades desse inibidor.

2.1. Objetivos específicos

Os objetivos específicos deste trabalho são:

- ✓ Analisar a composição do plasma de serpentes da espécie *Bothrops jararaca* em diferentes idades (neonatos, jovens e adultos), machos e fêmeas, com enfoque em PLIs, através de técnicas de reconhecimento de interação por SDS-PAGE, *Western blotting*, ELISA, cromatografia de afinidade e espectrometria de massas.
- ✓ Investigar e elucidar os efeitos do γ BjPLI isolado do soro de *Bothrops jararaca* na ação anticoagulante da crotoxina.
- ✓ Estudar e comparar a interação do γ BjPLI com PLA₂ dos venenos das serpentes *Crotalus durissus terrificus* (Asp-49) e *Bothrops jararacussu* (Lys-49), através de técnicas *in vitro* e *in vivo*.
- ✓ Clonar e expressar o γ BjPLI na forma recombinante.

3. Materiais e Métodos

3.1. Animais

3.1.1. Camundongos

Foram utilizados camundongos BALB/c, fêmeas, pesando entre 18-22 g, fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan e mantidos no biotério de experimentação do Laboratório de Herpetologia, sob condições de temperatura e umidade controladas, além de água e alimento *ad libitum*. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – nº 7751060117 e 7598110219) e seguindo as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

3.1.2. Serpentes

As serpentes, espécimes neonatos, jovens e adultos, machos e fêmeas da espécie *B. jararaca* foram fornecidas pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (**Tabela 1**). Todas as serpentes foram mantidas em cativeiro, em caixas plásticas, sob temperatura (23–26 °C) e umidade (~ 60 %) controladas, em um ciclo de 12 h de claro e 12 h de escuro, recebendo água *ad libitum* e alimentação (*Mus musculus* e/ou *Rattus norvegicus*) a cada 15 dias (GREGO et al., 2021). Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – nº 7751060117) e seguindo as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Tabela 1 – Informações das amostras de neonatos, jovens e adultos da espécie *B. jararaca*.

	Identificação	Idade	Origem geográfica[#]	Sexo	Número de indivíduos^{&}
Neonato	NF1	2 dias	Araçariguama - SP	Fêmea	6
	NF2	2 dias	Piedade - SP	Fêmea	4
	NF3	2 dias	Itapevi - SP	Fêmea	5
	NF4	2 dias	Cotia - SP	Fêmea	4
	NF5	2 dias	São Bento do Sul - SC	Fêmea	4
	NF6	2 dias	Araçariguama - SP	Fêmea	4
	NM1	2 dias	Araçariguama - SP	Macho	8
	NM2	2 dias	Piedade - SP	Macho	7
	NM3	2 dias	Itapevi - SP	Macho	9
	NM4	2 dias	Cotia - SP	Macho	4
	NM5	2 dias	São Bento do Sul - SC	Macho	7
	NM6	2 dias	Araçariguama - SP	Macho	5
Jovem	JF1	16 meses	São Bento do Sul -SC	Fêmea	-
	JF2	19 meses	São Bento do Sul -SC	Fêmea	-
	JF3	20 meses	Machado - MG	Fêmea	-
	JF4	20 meses	Machado - MG	Fêmea	-
	JF5	20 meses	Juquitiba - SP	Fêmea	-
	JF6	20 meses	Cotia - SP	Fêmea	-
	JM1	16 meses	Ibiúna - SP	Macho	-
	JM2	16 meses	São Bento do Sul -SC	Macho	-
	JM3	19 meses	São Bento do Sul -SC	Macho	-
	JM4	19 meses	São Bento do Sul -SC	Macho	-
	JM5	20 meses	Machado - MG	Macho	-
	JM6	20 meses	Juquitiba - SP	Macho	-
	JM7	20 meses	Juquitiba - SP	Macho	-
	Adulto	AF1	2 anos e 11 meses*	São Bento do Sul -SC	Fêmea
AF2		6 anos e 2 meses*	São Francisco de Paula - RS	Fêmea	-
AF3		4 anos e 6 meses*	Embu das Artes - SP	Fêmea	-
AF4		3 anos e 1 meses*	São Bento do Sul - SC	Fêmea	-
AF5		1 anos e 11 meses*	Mairiporã -SP	Fêmea	-
AM1		3 anos e 6 meses*	Cotia - SP	Macho	-
AM2		3 anos*	São Luiz do Paraitinga - SP	Macho	-
AM3		2 anos e 1 meses*	Juquitiba - SP	Macho	-
AM4		3 anos*	Ibiúna - SP	Macho	-
AM5		2 anos e 2 meses*	Tapirar - SP	Macho	-

* A idade dos adultos refere-se ao tempo em que estão em cativeiro.

A origem geográfica de neonatos e espécimes jovens refere-se à origem geográfica de onde a mãe foi capturada na natureza, uma vez que todos esses animais nasceram em cativeiro.

& "Número de indivíduos" refere-se ao número de amostras usadas para formar o *pool* de plasma do grupo de neonatos.

3.2. Venenos

Os venenos das serpentes foram obtidos através da extração manual conforme a padronização do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan (GREGO et al., 2021). Os venenos coletados das serpentes da espécie *B. jararaca* foram centrifugados a 1700 x g por 15 min para remoção de células epiteliais, sangue ou saliva. Em seguida, os sobrenadantes foram separados, liofilizados e armazenados a -20 °C até o momento da análise.

3.3. Plasma

Após a serpente *B. jararaca* ser contida em tubos plásticos de PVC transparente, o sangue foi coletado por punção da veia caudal utilizando seringas plásticas em tubos contendo solução anticoagulante de citrato de sódio 3,8%, em uma proporção de nove volumes de sangue para um volume de anticoagulante. Os plasmas foram obtidos pela centrifugação a 1200 x g, por 15 min e estocados a -20 °C até o momento da análise.

3.4. Dosagem de proteínas

A concentração de proteínas das amostras foi determinada pelo ensaio colorimétrico de Bradford (1976). Brevemente, em uma placa de 96 poços, 5 µL das amostras de plasma foram incubadas com 250 µL do reagente *Protein Assay Dye Reagent Concentrate* (Bio-Rad), à temperatura ambiente, por 10 min, seguindo as indicações do fabricante. A leitura foi realizada a 595 nm em leitor de placas Spectramax i3 (Molecular Devices). A determinação da concentração de proteínas foi realizada por meio de uma curva padrão, utilizando-se soroalbumina bovina (Sigma).

A dosagem direta de proteínas também foi feita utilizando o NanoDrop One (Thermo Fisher Scientific) a 280 nm, com uma porcentagem estimada do coeficiente de extinção ($\epsilon_{1\%}$) de 10, para acompanhar a eluição de proteínas durante a execução de cromatografias. A análise foi realizada em triplicata e os dados foram plotados em mg/mL.

3.5. Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

Para comparar os diferentes perfis das proteínas dos plasmas das serpentes em diferentes faixas etárias (neonatos, jovens e adultos) as amostras foram submetidas à SDS-PAGE 12% ou 15%, segundo Laemmli (1970). Por canaleta, foram aplicados 20 µg de proteína. Os géis de

poliacrilamida foram corados utilizando-se *Coomassie Blue* R350, de acordo com as recomendações do fabricante (G.E. Healthcare).

3.6. *Western blotting*

O método descrito por Harlow e Lane (1988) foi utilizado para verificar a ocorrência de interações entre as proteínas do plasma com o veneno de *B. jararaca*, comparando as amostras dos diferentes grupos (neonatos, jovens e adultos). As proteínas presentes no plasma, após eletroforese, foram transferidas para uma membrana de PVDF (G.E. Healthcare), previamente equilibrada em tampão de transferência (Tris-HCl 25 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0,037%, pH 9,2) em um sistema *Trans-Blot Turbo Transfer System* (Bio-Rad) a 20 V por 35 min. Após a transferência, a membrana foi incubada sob agitação com solução bloqueadora (leite desnatado 5% e tween 20 0,01%) por 15 h a 4 °C. Em seguida, a membrana foi incubada com 40 µg de veneno de *B. jararaca* em solução de incubação (leite desnatado 0,5% e tween 20 0,01%), por 1 h à temperatura ambiente. A membrana foi então incubada com o anticorpo anti-botrópico diluído 1:1.000 em solução de incubação por 2 h à temperatura ambiente. Por fim, a membrana foi incubada com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase) diluído 1:10.000 em tampão de incubação por 2 h à temperatura ambiente. A reação foi revelada adicionando-se o substrato cromogênico (5 mg de 3,3'-diaminobenzidina (tetrahydroclorato) em 10 mL de tampão imidazol 0,1 M, 125 µL de CoCl₂ 0,2 M e 3,4 µL H₂O₂ 30%). A reação foi interrompida pela adição de água destilada em abundância.

3.7. *Cromatografia de afinidade*

A captura dos componentes do plasma com afinidade por proteínas do veneno foi feita por meio de protocolo modificado de Pla e colaboradores (2017). Para a preparação da coluna de afinidade, 0,1 g de resina cromatográfica (Sepharose CNBr-ativada, G.E. Healthcare) foi hidratada com 750 µL de HCl 1 mM pH 2,7. A resina foi lavada com 15 volumes de coluna (VC; 350 µL) de solução de hidratação e equilibrada com 2 VC de solução de acoplamento (NaHCO₃ 0,2 M e NaCl 0,5 M pH 8,5). Após a resina ser hidratada e equilibrada, foi incubada com 6 mg de veneno de *B. jararaca* suspensos em 1 VC de solução de acoplamento, por 2 h sob agitação. Após a incubação, a coluna de afinidade foi lavada com 10 VC de tampão de acoplamento e bloqueada com Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, *overnight* sob agitação. Após esses processos, foi utilizado 5 VC do tampão de lavagem ácido (acetato de

sódio 0,1 M e NaCl 0,5 M pH 4,0) e 5 VC de tampão de lavagem básico (Tris-HCl 0,1 M e NaCl 0,5 M pH 8,0), repetindo essas lavagens 2 vezes.

Com o veneno previamente acoplado à resina, a coluna de afinidade foi equilibrada com 10 VC de PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, Na₂HPO₄ 10 mM, KH₂ PO₄ 1,7 mM, pH 7,4). Três mg de proteínas do plasma de cada grupo de *B. jararaca*, suspensos em 500 µL de PBS, foram aplicados na coluna, a qual foi mantida sob agitação por 2 h. Após a incubação, as proteínas não retidas foram recolhidas com 2 VC de PBS. E então, a coluna foi reequilibrada com PBS. As proteínas de interesse foram eluídas com 10 VC de tampão de eluição (tampão glicina-HCl 0,1 M pH 2,7), o eluído foi recolhido em frações de 2 VC cada em microtubos contendo 100 µL de Tris-HCl 1M pH 8,8, para neutralizar o pH ácido do tampão de eluição. Por fim, a coluna foi armazenada em PBS com etanol 20%.

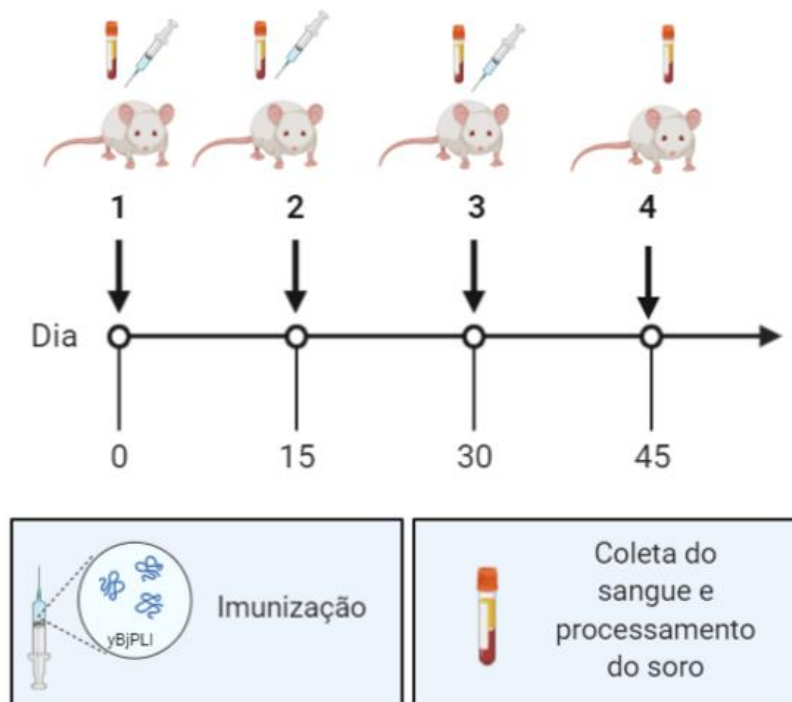
3.8. Produção de anti- γ BjPLI e dosagem de γ BjPLI no plasma de *B. jararaca*

3.8.1. Imunização

Para essa etapa contamos com a colaboração da Dra. Marisa Maria Teixeira da Rocha do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, seguindo os protocolos descritos por Santos-Filho e colaboradores (2016) e Harlow e Lane (1988), com modificações.

Inicialmente, nove camundongos BALB/c fêmeas, com massa entre 18 e 22 gramas, tiveram os olhos anestesiados com uma gota de cloridrato de tetracaína a 1% e cloridrato de fenilefrina a 0,1% (Allergan). Em seguida, cerca de 200 µL de amostras de sangue foram coletadas por punção do plexo orbital para obtenção de soro pré-imune (controle negativo). Posteriormente, os camundongos foram imunizados por injeção subcutânea de 10 µg/camundongo de γ BjPLI isolado, purificado de acordo com Serino-Silva e colaboradores (2018), com 50 µg de hidróxido de alumínio como adjuvante em 100 µL de salina (NaCl 0,85%). Duas injeções de reforço adicionais foram administradas a cada 15 dias após a primeira injeção. Amostras de sangue imune (cerca de 200 µL) foram coletadas a cada 15 dias após a primeira imunização, por punção do plexo orbital, por três vezes (**Figura 3**). O soro foi separado dos coágulos por centrifugação a 1500 x g por 15 min, aliquoteado e armazenado a -20 C.

Figura 3 - Representação esquemática do protocolo experimental para imunização de camundongos usando γ BjPLI.



3.8.2. Titulação de anticorpo

Os títulos dos anticorpos do soro de camundongos imunizados foram determinados por ELISA em placas de 96 poços, com modificações do protocolo descrito por Oguiura e colaboradores (2000). A sensibilização da placa ocorreu através da adição de 5 μ g de proteínas do plasma (*pool* de amostras de 9 espécimes sem discriminação de idade) de *B. jararaca* em 100 μ L de tampão carbonato (Na_2CO_3 34 mM e NaHCO_3 15 mM, pH 9,6) a qual foi mantida por 16 h a 4 °C. As placas foram então lavadas três vezes com solução salina tamponada com fosfato (PBS) contendo tween 20 a 0,05% (tampão de lavagem) e em seguida, as placas foram bloqueadas com 200 μ L de tampão carbonato (pH 9,6) contendo 5% de leite desnatado por 2 h a 37 °C. Após três lavagens de 5 min cada, os poços foram incubados com diferentes diluições do soro em tampão de bloqueio contendo 0,05% de tween 20 (tampão de incubação) durante 1 h a 37 °C. Novas três lavagens (5 min cada) foram feitas e os poços foram incubados com o segundo anticorpo conjugado com peroxidase (IgG anti-camundongo) (Sigma) diluído em tampão de incubação (1: 5000). Após 1 h de incubação a 37 °C, as placas foram lavadas três vezes com tampão de lavagem e os complexos foram visualizados usando 100 μ L de 1 mg de orto-fenilenodiamino/mL (Sigma) em tampão citrato de sódio 0,2 M pH 5,0, contendo 0,01% de H_2O_2 , e o aumento da cor foi interrompido pela adição de 50 μ L de H_2SO_4 30%. A

absorbância foi mensurada à 492 nm em leitor de microplaca (SpectraMax i3, Molecular Devices). Todas as amostras foram testadas em triplicata e os resultados foram expressos como média e \pm DP.

3.8.3. *Western blotting*

O protocolo seguido foi similar ao descrito na **seção 3.6**, porém, a membrana (contendo amostras dos *pools* de plasma de *B. jararaca*) foi incubada com anti- γ BjPLI (1:1000) em solução de incubação (leite desnatado 0,5% e tween 20 0,01%), por 1 h à temperatura ambiente. Em seguida, a membrana foi incubada com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de camundongo conjugado com peroxidase, Sigma) diluído 1:10000 em tampão de incubação por 2 h à temperatura ambiente.

3.8.4. Dosagem de γ BjPLI por ELISA

Placas de 96 poços foram sensibilizadas com 5 μ g de proteínas do plasma de *B. jararaca* (amostras individuais ou em *pool*) em 100 μ L de tampão carbonato durante 16 h a 4 °C, seguindo o protocolo semelhante da **seção 3.8.2**. Porém a incubação com o soro de camundongos imunizados foi mantida na proporção 1:200. Todas as amostras foram testadas em triplicata. Os resultados foram expressos como média \pm DP e analisados por ANOVA de uma via seguido por Tukey como teste *a posteriori* para comparação das diferenças entre grupos.

3.9. *Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF)*

A análise proteômica dos plasmas de *B. jararaca* foi realizada em colaboração com o Prof. Dr. Alexandre Keiji Tashima, no Laboratório de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP). As análises foram realizadas com as amostras dos *pools* de cada grupo estudado, sendo elas, plasma de neonatos fêmeas (NF), neonatos machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM), de acordo com o protocolo descrito a seguir.

3.9.1. *Digestão em solução das amostras*

Cem microgramas de plasma liofilizado foram dissolvidos em 50 μ L de bicarbonato de amônio 50 mM e incubados com 25 μ L de RapiGest 0,2% (Waters) a 80 °C por 15 min, seguido por centrifugação a 2000 x *g* por 3 min. As amostras foram reduzidas com ditioneitol (DTT)

em concentração final de 5 mM por 30 min a 60 °C e então alquiladas com iodoacetamida (IAA) em concentração final de 15 mM incubadas em temperatura ambiente, no escuro, por 30 min. Em seguida, foram reincubadas com DTT em temperatura ambiente por 15 min. As proteínas foram digeridas utilizando-se tripsina (Promega) na proporção 1:100 (enzima:substrato), a 37 °C *overnight*. Após a digestão, foi adicionado 10 µL de ácido trifluoroacético 5% (concentração final de 0,7%) para interrupção da reação e clivagem do surfactante, sendo incubadas a 37 °C por 45 min.

As amostras foram então submetidas à extração em fase sólida com *tips* de C18 e eluídas com 40% de acetonitrila (Rappsilber; Mann; Ishihama). Os *tips* foram montados com resina InertSep RP-C18 (GL Sciences) e membrana SDB-XC (Empore, 3 M) dentro das pontas de pipeta P200. Os eluatos foram secos em um concentrador de vácuo (*Concentrator Plus*, Eppendorf) e armazenados a -20 °C até a análise (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019; MADEIRA et al., 2019).

3.9.2. Análise das amostras digeridas por espectrometria de massas

A análise dos peptídeos foi realizada em espectrômetro de massas Synapt G2 (Waters) acoplado a um sistema de *ultra high performance liquid chromatography* (UPLC) (Waters). Aproximadamente 12,5 µg da mistura peptídica foram aplicados em coluna trap Symmetry C18 (partículas de 5 µm, 300 µm x 25 mm, Waters), em fluxo de 8 µL/min, utilizando uma solução de acetonitrila 5% e ácido fórmico 0,1% em água deionizada (solução A), por 5 min.

Os peptídeos retidos pela coluna *trap* foram subsequentemente separados utilizando-se uma coluna analítica C18 (Acquity HSS T3 300 µm x 150 mm, Waters) por um gradiente de 7 a 35% de acetonitrila e 0,1% de ácido trifluoroacético (solução B) por 60 min, em fluxo de 3 µL/min.

A aquisição de dados foi realizada no modo independente UDMSE com separação da mobilidade iônica na região de m/z entre 50 e 2.000. As energias de colisão foram alternando-se entre os modos de baixa energia (4 eV) e de alta energia de colisão com rampa de 17-60 eV utilizando-se tempos de *scan* de 1 segundo. A fonte de ESI (*electron spray ionization*) foi operada no modo positivo com a voltagem do capilar de 3,0 kV, temperatura de 100 °C e voltagem do cone de 40 V. Para a calibração de massas, uma solução de [Glu1]-Fibrinopeptídeo B (500 fmol/mL em metanol 50% e ácido fórmico 0,1%) (Peptide 2.0) foi infundida por meio

do spray de referência em fluxo de 2 $\mu\text{L}/\text{min}$ e amostrada a cada 60 seg (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019; MADEIRA et al., 2019).

3.9.3. Identificação de proteínas por busca em banco de dados

A quantificação *Label-free* (LFQ) foi realizada no Progenesis QI para proteômica (*NonLinear Dynamics*) conforme relatado anteriormente (ABREU et al., 2017; CÂMARA et al., 2020). Resumidamente, os arquivos brutos foram carregados no software e as amostras foram alinhadas com base no tempo de retenção do íon precursor da execução de referência que foi escolhido automaticamente. Os parâmetros de pico de seleção padrão foram aplicados. Os dados MS foram processados pelo módulo Apex3D usando um limite de baixa energia de 750 contagens e alto limite de energia de 50 contagens. Os espectros MS/MS foram exportados como arquivo .mgf para identificação de proteínas no PEAKS Studio 7.5 (solução de bioinformática Inc.), e analisados contra sequências de "serpentes AND inibitor" e "serpentes AND serum" do UniprotKB / Swissprot (www.uniprot.org; totalizando 1245 sequências; baixado em 22 de junho de 2021).

Os parâmetros de pesquisa foram definidos da seguinte forma: tolerância de massa de 10 ppm para o precursor íons e 0,025 Da para íons de fragmento, até dois locais de clivagem perdidos permitidos para digestão de tripsina, FDR de 1% no nível de peptídeo e mínimo de 1 peptídeo único por proteína. Os resíduos de carbamidometil cisteína foram selecionados como fixos para modificação, acetilação N-terminal e oxidação de metionina como modificações variáveis. A identificação dos resultados foram então reimportados para o Progenesis como um arquivo .pepXml. Proteínas foram quantificadas calculando a soma de todas as abundâncias de peptídeos normalizados únicos correspondendo a essa proteína, usando peptídeos atribuídos de forma inequívoca. Para comparação, o alinhamento de algumas proteínas foi feito utilizando o Clustal Omega e a predição de peptídeo sinal foi feita pelo SignalP 5.0 (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019; MADEIRA et al., 2019).

3.10. Obtenção das amostras isoladas de PLA₂ e γBjPLI

A purificação da crotoxina a partir do veneno bruto de *C. d. terrificus* foi realizada utilizando o protocolo descrito por Landucci e colaboradores (1994). A PLA₂ Asp-49 do veneno de *C. d. terrificus* foi cedida pelo laboratório do Dr. Marcos Hikari Toyama, Instituto de Biociência da Universidade Estadual Paulista, a qual foi isolada seguindo o protocolo

descrito por Beguini e colaboradores (2000). A PLA₂ Lys-49 foi isolada a partir do veneno de *B. jararacussu*, seguindo o protocolo descrito por Soares e colaboradores (1998). O inibidor γ BjPLI foi isolado de acordo com Serino-Silva e colaboradores (2018).

3.11. Tromboelastometria

Para essa etapa contamos com a colaboração do Dr. Benedito Carlos Prezoto do Laboratório de Farmacologia, Instituto Butantan, seguindo os protocolos descritos por Prezoto e Oguiura (2020 e Whiting e Dinardo (2014), com modificações. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB – nº 7769050219) e seguindo as normas estabelecidas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA).

Para avaliar a capacidade de inibição da atividade anticoagulante da crotoxina pelo PLI foi realizado o ensaio de tromboelastometria. Para a obtenção de plasma citratado de galinha (*Gallus gallus*), as galinhas adultas foram submetidas à contenção mecânica com as asas abertas, suas penas retiradas e a região acima da veia braquial submetida a anestesia local com *spray* de xilocaína. Pequenas incisões foram então realizadas ao redor da veia da asa braquial. Oito mililitros de amostras de sangue total foram coletados usando seringas contendo 1:10 (v / v) de citrato trissódico a 3,2% e a seguir suturadas com fio de algodão. O plasma de galinha foi obtido após centrifugação a 3000 x g durante 20 min a 4 °C. As amostras de plasma foram usadas imediatamente ou mantidas a - 80°C.

O parâmetro tempo de coagulação (TC) do perfil ROTEM foi avaliado em um sistema de quatro canais (Pentapharm) a 37 °C, de acordo com as instruções do fabricante para o método ROTEM com ativação da via intrínseca da coagulação (ensaio INTEM), com duração de uma hora e n = 4, em cinco grupos experimentais.

- Grupo 1: 260 μ L de plasma de galinha + 20 μ L de CaCl₂ (0,2 M) + 60 μ L de PBS = 340 μ L
- Grupo 2: 260 μ L de plasma de galinha + 20 μ L de CaCl₂ (0,2 M) + 60 μ L contendo doses crescentes de aPTT *clot* (reagente ativador da via intrínseca da coagulação, contendo ácido elágico e fosfolipídeos sintéticos, BIOS Diagnostica) em PBS = 340 μ L
- Grupo 3: 260 μ L de plasma de galinha + 20 μ L de CaCl₂ (0,2 M) + 60 μ L de dose fixa de aPTT *clot* contendo 100 ng de crotoxina em PBS = 340 μ L

- Grupo 4: 260 μL de plasma de galinha + 20 μL de CaCl_2 (0,2 M) + 60 μL de dose fixa de aPTT *clot* contendo 100 ng de crotoxina e 500 ng de γBjPLI (proporção molar de Ctx-PLI de 1:5,4) em PBS = 340 μL
- Grupo 5: 260 μL de plasma de galinha + 20 μL de CaCl_2 (0,2 M) + 60 μL de dose fixa de aPTT *clot* contendo 500 ng de γBjPLI em PBS = 340 μL

O valor de TC obtido no Grupo 1 possui duração mínima de 1800 seg até o surgimento espontâneo de coágulos. Este valor foi considerado como porcentagem mínima de coagulação (ou 0%) para a realização dos cálculos estatísticos. No Grupo 2, as doses crescentes do reagente aPTT *clot*, (BIOS Diagnostica) serviram para a padronização da dose efetiva média do ativador capaz de reduzir o parâmetro TC para um valor próximo a 900 seg (região média da curva dose-resposta), e assim seguir com os experimentos dos Grupos 3, 4 e 5.

Os valores do parâmetro TC foram monitorados em seg e expressos como média \pm DP em três experimentos independentes. As comparações de análise de variância (ANOVA) unilateral foram usadas, seguido por teste de comparações múltiplas de Tukey.

3.12. Dicroísmo circular

Para essa etapa contamos com a colaboração do Dr. Marcos Hikari Toyama do Laboratório de Interação Proteína-droga, Instituto de Biociência, Universidade Estadual Paulista, seguindo o protocolo descrito por Soares e colaboradores (2003), com modificações.

Sendo assim, 30 μg de PLA_2 Asp-49, PLA_2 Lys-49 e γBjPLI isolados ou incubados (proporção molar de PLA_2 -PLI, 1:0,6) foram dissolvidos em Tris-HCl 0,002 M, contendo NaCl 0,015 M e CaCl_2 0,1 mM (pH 8,0). Após centrifugação a 4000 x g durante 5 min, as amostras foram transferidas para uma cubeta de quartzo de 1 mm de comprimento.

Os espectros de dicroísmo circular na região do comprimento de onda UV (180-260 nm) foram adquiridos com um espectropolarímetro J815 (Jasco Corporation), utilizando uma banda de 1 nm e um tempo de resposta de 1 seg. A coleta de dados foi realizada à temperatura ambiente com uma velocidade de varrição de 100 nm/min. Nove imagens foram obtidas para cada amostra e todos os espectros foram corrigidos subtraindo os tampões. Os dados foram exportados pelo software Spectra manager e as porcentagens relativas de estruturas secundárias

da proteína foram determinadas pelo software *Circular Dichroism analysis using Neural Networks* (CDNN).

3.13. Atividade enzimática

A dosagem da atividade fosfolipásica foi realizada de acordo com Holzer e Mackessy (1996), com algumas alterações. A atividade de PLA₂ foi mensurada em placa de 96 poços usando como substrato ácido 4-nitro-3-octanoyloxybenzóico (4N3OBA, Enzo). Em cada poço, foram adicionados 200 µL de tampão (Tris-HCl 10 mM, CaCl₂ 10 mM, e NaCl 100 mM, pH 7,8), 20 µL de substrato 4N3OBA (1 mg/mL em acetonitrila 100%), 20 µL de água e 20 µL de PLA₂ Asp-49 (20 µg) ou Lys-49 (20 µg). Em seguida, a reação foi incubada por 40 min a 37 °C, sendo a sua absorbância a 425 nm monitorada em intervalos de 10 min utilizando em um leitor de placas Spectramax i3 (Molecular Devices). A atividade específica da reação foi calculada com base no aumento da absorbância após 30 min.

Para avaliar o potencial inibitório, antes de adicionar o substrato, foram substituídos os 20 µL de água deionizada por 20 µL de 40 µg de γBjPLI em salina (proporção molar de PLA₂-PLI de 1:1,2) e mantido incubado por 30 min em local protegido da luz. Após a adição do substrato, a reação foi acompanhada durante 40 min, a 37 °C, por absorbância a 425 nm, em intervalos de 10 min utilizando um leitor de placas Spectramax i3 (Molecular Devices). A atividade específica da reação foi calculada com base no aumento da absorbância após 30 min. As absorbâncias foram transformadas em velocidade de reação do substrato, e foram plotadas como U/mg/min. Os resultados foram analisados com ANOVA de uma via, com Tukey como teste *a posteriori*, e os valores de $p < 0,001$ foram considerados significativos.

3.14. Atividade miotóxica

De acordo com o protocolo descrito por Stábeli e colaboradores (2006), com modificações, para avaliar o potencial inibitório do γBjPLI, foram injetadas, no músculo gastrocnêmio direito de camundongos Swiss machos, pesando entre 18 e 22 g (n=5/grupo), as seguintes soluções, previamente incubadas (proporção molar de PLA₂-PLI de 1:1,2) durante 30 min:

- Controle: 50 µL de salina (NaCl 0,85%)
- Grupo 1: 50 µL de γBjPLI (20 µg)
- Grupo 2: 50 µL de PLA₂ Asp-49 (10 µg)

- Grupo 3: 50 μ L de PLA₂ Lys-49 (10 μ g)
- Grupo 4: 50 μ L de PLA₂ Asp-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g)
- Grupo 5: 50 μ L de PLA₂ Lys-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g)

Foram coletados 200 μ L de sangue de cada camundongo, via cauda, em um tubo contendo 20 μ L de citrato de sódio 3,8%, como anticoagulante. Em seguida, o sangue foi centrifugado a 1200 x g, por 15 min, o plasma foi separado e armazenado a -80 °C, até o momento do ensaio. A quantidade de creatina-quinase (CK) foi então determinada com 10 μ L de plasma incubados, durante 20 min a 37 °C, com 100 μ L do reagente reconstituído que continha o substrato, de acordo com o protocolo do kit comercial de CK (Sigma-Aldrich). Em seguida, foi realizada a mensuração por 340 nm em leitor de microplaca. A atividade resultante foi expressa em U/L. Os resultados obtidos foram analisados com ANOVA de uma via, com Tukey como teste *a posteriori*. Valores de $p < 0,0001$ foram considerados significativos.

3.15. Avaliação do edema de pata

A avaliação da neutralização do edema de pata foi feita de acordo com o protocolo descrito por Stábili e colaboradores (2006), com algumas modificações. Foi realizada uma única injeção subplantar, em camundongos Swiss, machos, pesando entre 18 e 22 g ($n=5$ /grupo), das seguintes soluções, previamente incubadas (proporção molar de PLA₂-PLI de 1:1,2) durante 30 min:

- Controle: 20 μ L de salina (NaCl 0,85%)
- Grupo 1: 20 μ L de γ BjPLI (20 μ g)
- Grupo 2: 20 μ L de PLA₂ de Asp-49 (10 μ g)
- Grupo 3: 20 μ L de PLA₂ de Lys-49 (10 μ g)
- Grupo 4: 20 μ L de PLA₂ de Asp-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g)
- Grupo 5: 20 μ L de PLA₂ de Lys-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g)

Como controle da injeção, na pata contralateral foi injetado o mesmo volume de veículo. A espessura da pata foi medida utilizando um paquímetro digital, imediatamente antes da injeção e nos seguintes tempos após a injeção: 30 min, 1 h, 2 h, 4 h, 6 h e 24 h. Os resultados foram expressos como o aumento na espessura da pata (mm) subtraindo o valor do grupo controle. Os resultados foram analisados com ANOVA de duas vias, com Tukey como teste a

posteriori. A inibição da atividade do edema também foi analisada calculando a área sob a curva. Valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos

3.16. Clonagem do γ BjPLI

Esta etapa do trabalho foi feita em colaboração com a Dra. Aparecida Sadae Tanaka, do Departamento de Bioquímica da Universidade Federal de São Paulo (UNIFESP).

3.16.1. Amplificação do gene

A sequência nucleotídica correspondente ao inibidor γ BjPLI foi inicialmente amplificada através da reação em cadeia de polimerase (PCR), utilizando-se dois *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) complementares às extremidades 3' e 5' do gene para a polimerização pela *Taq* DNA polimerase. Os *primers* foram produzidos de acordo com a sequência do γ BjPLI já descrita por Serino-Silva (2018) contendo sítios de restrição para as enzimas NdeI e BamHI, para facilitar a clonagem unidirecional em vetores de expressão escolhidos, além disso, o DNA foi amplificado a partir da biblioteca construída por Gomes e colaboradores (2017).

A amplificação via PCR foi realizada em um termociclador (*Applied Biosystems Verit*, Thermal Cycler), empregando-se um volume final de 50 μ L, contendo 0,5 μ L de cada um dos *primers* a partir de uma concentração de 50 nmol/ μ L, 5 μ L de cDNA, 5 μ L de tampão 10X, 1 μ L de dNTPs (20 mM), 0,4 μ L de MgCl₂ e 36,6 μ L de água estéril.

As condições de amplificação compreenderam uma desnaturação inicial a 94 °C por 5 min, seguido por 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 1 min, anelamento a 50 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 1 min, por fim uma extensão final de 72 °C por 3 min. Ao final da reação, a mesma foi interrompida por resfriamento a 4 °C.

Os produtos das amplificações foram analisados aplicando-se 5 μ L das amostras das reações e 1 μ L de tampão corante azul (6X) em gel de agarose 1% contendo 50 μ g de brometo de etídeo por mL. Em seguida, o gel foi submetido a uma tensão de 100 V por cerca de 30 min e, após migração, foi analisado sob luz UV.

3.16.2. Purificação dos produtos amplificados por PCR

Após ter sido confirmado o tamanho correto dos fragmentos de DNA obtidos, foram feitas cinco novas repetições do PCR descrito no tópico anterior, em seguida foi feito um *pool* dessas amostras e novamente foram separados em um gel de agarose.

A banda desejada foi então excisada do gel e purificada utilizando-se o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, os fragmentos de DNA foram eluidos em 30 μL de água estéril. O resultado da extração foi analisado por eletroforese em gel de agarose 1% e quantificado por absorbância a 260 nm.

3.16.3. Clonagem dos produtos de PCR o vetor de clonagem pGEM-T *easy* – Reação de ligação

Para a reação de ligação foi preparado um volume final de 10 μL constituídos de 7 μL de produto de PCR (703,22 fmol), 1 μL de enzima T4 DNA ligase (6U), 1 μL do tampão de ligação para a enzima T4 DNA ligase (10X) e 4 μL da solução contendo o vetor pGEM-T *easy* a 50 ng/ μL . Esta reação foi mantida a temperatura ambiente por 5 h. As misturas de ligação foram utilizadas na transformação por eletroporação de células competentes de *E. coli* DH5 α (Invitrogen).

Em seguida, o vetor contendo a sequência de DNA de interesse foi precipitado. Para isso, foi acrescido aos 10 μL de solução de ligação 1 μL de acetato de sódio (3 M pH 5,2) e 25 μL de etanol 100% (gelado), incubado por 15 min no *freezer*, centrifugado a 13000 rpm por 20 min, e após descarte do sobrenadante e lavado com 10 volumes de etanol 70%, o *pellet* foi suspenso em 5 μL de água estéril.

3.16.4. Transformação da bactéria *E coli* DH5 α com o plasmídeo recombinante pGEM-T *easy*

As células competentes que já estavam sendo mantidas em glicerol a -80 °C (50 μL) foram mantidas por 15 min em banho de gelo. Aos 50 μL de células competentes foram adicionados 5 μL do resultado da reação de ligação. As amostras foram gentilmente homogeneizadas e mantidas em banho de gelo por 1 min. Em seguida, os 55 μL foram transferidos para a cubeta de eletroporação e submetidos a 500 v por 10 msec. Imediatamente, foram adicionados 950 μL do meio SOC (extrato de levedura 0,5%, bactotripton 2%, NaCl 10

mM, KCl 2,5 mM, MgCl₂ 10 mM, MgSO₄ 10 mM e glicose 20 mM), gentilmente homogeneizada por 1 h e plaqueada em placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio seletivo Luria-Bertani sólido (LB; 15 g de extrato de levedura, 10 g de bacto-triptona, 10 g de NaCl e 15 g de ágar por litro de solução a pH 7,5) suplementado com antibiótico de seleção ampicilina (para uma concentração final de 200 µg/mL). Por fim, a placa foi incubada em estufa a 37 °C *overnight*.

3.16.5. Confirmação de colônias positivas e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pGEM-T *easy* de *E. coli* DH5α

Para confirmação de quais colônias de *E. coli* possuíam o vetor pGEM-T *easy* e o fragmento correspondente ao γBjPLI, foram selecionadas algumas colônias resistentes à ampicilina que cresceram na placa de Petri, e em seguidas foram submetidas a uma reação de PCR. Na qual, para um volume final de 50 µL, foram adicionados 26 µL de amostra de colônia em água estéril, 1 µL de *primer* promotor M13, 1 µL de *primer terminator* M13, 5 µL de tampão para *Taq* polimerase (10X) e 1 µL de dNTPs. As amostras foram amplificadas seguindo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido por 30 ciclos constituídos de desnaturação a 94 °C por 45 seg, anelamento a 50 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 1 min, por fim uma extensão final de 72 °C por 1 min. Ao final da reação, ela foi interrompida por resfriamento a 4 °C.

Os produtos das ampliações foram analisados aplicando-se 5 µL das amostras das reações e 1 µL de tampão corante azul 6 X concentrado em gel de agarose 1% contendo 50 µg de brometo de etídeo por mL. Em seguida, o gel foi submetido à tensão de 100 V por cerca de 30 min e após migração foi analisado sob luz UV.

Com o restante (55 µL) dos produtos de amplificação de duas colônias (12 e 18) foi feito um novo gel de agarose 1%, para purificação da banda para isolamento e sequenciamento das bases nitrogenadas presente na banda. A banda desejada foi então excisada do gel e purificada utilizando-se o *QIAquick PCR Purification Kit* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. Por fim, os fragmentos de DNA foram eluídos em 30 µL de tampão de eluição do kit, seguido por dosagem por absorbância a 260 nm.

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se 90 ng de DNA, 2 µL do *Dynamic™ ET Terminator Cycle Sequencing Kit* (GE Healthcare), oligonucleotídeos *forward*

ou *reverse* (5 pmol), o volume da reação foi ajustado com água para um volume final de 10 μL . A reação foi realizada em solução tampão Tris-HCl 80 mM pH 9,0, contendo MgCl_2 2 mM, utilizando-se o seguinte programa: 30 ciclos de (95 °C por 20 min, 50 °C por 15 seg, 60 °C por 60 seg). Os produtos das reações foram precipitados e suspensos em 3 μL da solução *formamide loading dye* (Applied Biosystems) e analisados em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3130 (Applied Biosystems). Em seguida, as sequências obtidas foram analisadas.

Após confirmação da colônia com sequência correta, as colônias desejadas foram replicadas individualmente em tubos para cultivo de bactérias contendo 100 mL de meio LB líquido (sem ágar) contendo ampicilina (em uma concentração final de 200 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Estes tubos foram incubados a 37 °C por cerca de 16 h, sob agitação de 250 rpm.

Por fim, os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit de purificação QIAGEN *Plasmid Midi* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e suspenso em 100 μL de água estéril. Em seguida foi feita a dosagem por absorvância a 260 nm e foi conferido o padrão de pureza e qualidade do DNA das bandas em um gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente (3.16.1).

3.16.6. Clonagem dos genes no plasmídeo de expressão pET28a

Antes das sequências codificantes de interesse serem inseridas no vetor pET28a através de uma nova ligação, a amostra do plasmídeo pGEM-T *easy* isolado da cepa de *E. coli* DH5 α e o plasmídeo pET28a foram submetidos a reação de digestão, de modo que ambos adquirissem extremidades coesivas complementares. Primeiramente, 8 μL de pET28a (138 ng/ μL) ou 2 μL de pGEM-T+ γBjPLI (2570 ng/ μL) foram incubados por 2 h a 37 °C com 1 μL da enzima Bam HI (Cellco, 2500 U), 1 μL de tampão para a enzima Bam HI (10X) e o volume foi ajustado com água estéril para o volume final de 15 μL . O padrão de bandas foi conferido por gel de agarose 1%, como descrito anteriormente (3.16.1). O restante das amostras foi precipitado por meio da adição de 0,1 volume de acetato de sódio (3 M pH 5,2) e 2,5 volumes de etanol 100%, incubação por 15 min no *freezer* e centrifugação a 13000 rpm por 20 min. Após descarte do sobrenadante e lavagem com 10 volumes de etanol 70%, o *pellet* foi suspenso em 8 μL de água estéril.

Posteriormente, 8 μL de pET28a ou 8 μL de pGEM-T+ γBjPLI foram incubados por 2 h a 37 °C com 1 μL da enzima Nde I (Invitrogen Anza), 1 μL de tampão para a enzima Nde I (10X)

e o volume foi ajustado com água estéril para o volume final de 10 μL . O padrão de bandas foi conferido por gel de agarose 1%, como descrito anteriormente (3.16.1).

Por fim, a amostra pGEM-T+ γBjPLI , resultante das clivagens, foi submetida à eletroforese em agarose 1% e a banda correspondente ao fragmento de DNA do γBjPLI foi purificada utilizando o QIAEX II Gel Extraction kit (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante. O fragmento de DNA correspondente ao γBjPLI foi suspenso em 20 μL de água estéril foi feito a dosagem por absorvância a 260 nm.

A reação de ligação foi preparada para um volume final de 15 μL constituídos de 2 μL correspondente ao fragmento de DNA do γBjPLI (592 fmol), 1 μL de enzima T4 DNA ligase (Promega, 3 U/L), 1,5 μL do tampão de ligação para a enzima T4 DNA ligase (10X) e 2 μL da solução contendo o vetor pET28a (34 fmol), portanto realizada numa proporção de 1:1 (vetor:fragmento). Esta reação foi mantida a 16 °C por 16 h.

Em seguida, o vetor contendo a sequência de DNA de interesse foi precipitado. Para isso, foi acrescido aos 10 μL de solução de ligação 1 μL de acetato de sódio (3 M pH 5,2) e 25 μL de etanol 100% (gelado), incubado por 15 min no freezer, centrifugado a 13000 rpm por 20 min, e após descarte do sobrenadante e lavado com 10 volumes de etanol 70%, o *pellet* foi suspenso em 5 μL de água estéril.

3.16.7. Transformação da bactéria *E coli* DH5 α com o plasmídeo recombinante pET28a

As células competentes, que já estavam sendo mantidas em glicerol a -80 °C (50 μL), foram mantidas por 15 min em banho de gelo. Aos 50 μL de células competentes foram adicionados 5 μL do resultado da reação de ligação. As amostras foram gentilmente homogeneizadas e mantidas em banho de gelo por 1 min. Em seguida, os 55 μL foram transferidos para a cubeta de eletroporação e submetidos a 500 v por 10 mseg. Imediatamente, aos 55 μL foram adicionados 950 μL do meio SOC, gentilmente homogeneizada por 1 h a 37 °C e plaqueada em placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio seletivo Luria-Bertani sólido (LB; 15 g de extrato de levedura, 10 g de bacto-triptona, 10 g de NaCl e 15 g de ágar por litro de solução a pH 7,5) suplementado com antibiótico de seleção canamicina (para uma concentração final de 20 $\mu\text{g}/\text{mL}$). Por fim, a placa foi incubada em estufa a 37 °C *overnight*.

3.16.8. Confirmação de colônias positivas e sequenciamento dos plasmídeos recombinantes pET28a de *E. coli* DH5α

Para confirmação de quais colônias de *E. coli* possuíam o vetor pET28a e o fragmento correspondente ao γ BjPLI, foram selecionadas algumas colônias resistentes a canamicina que cresceram na placa de Petri, e, em seguida foram submetidas a uma reação de PCR. Para um volume final de 50 μ L, foram adicionados 26 μ L de amostra de colônia em água estéril, 1 μ L de *primer* promotor T7P, 1 μ L de *primer terminator* T7F, 5 μ L de tampão para *Taq* polimerase (10X), 1 μ L de enzima *Taq* polimerase (Cellco, 5U/ μ L) e 1 μ L de dNTPs. As amostras foram amplificadas seguindo o seguinte protocolo: desnaturação inicial a 95 °C por 10 min, seguido por 30 ciclos constituídos de desnaturação a 95 °C por 1 min, anelamento a 48 °C por 45 seg e extensão a 72 °C por 1 min, por fim uma extensão final de 72 °C por 1 min. Ao final da reação, ela foi interrompida por resfriamento a 4 °C.

Os produtos das ampliações foram analisados aplicando-se 5 μ L das amostras das reações e 1 μ L de tampão corante azul 6 X concentrado em gel de agarose 1% contendo 50 μ g de brometo de etídeo por mL. Em seguida, o gel foi submetido a uma tensão de 100 V por cerca de 30 min e após migração foi analisado sob luz UV.

Após a confirmação da colônia com sequência correta, as colônias desejadas foram replicadas individualmente em tubos para cultivo de bactérias contendo 100 mL de meio LB líquido (sem ágar) contendo canamicina (em uma concentração final de 20 μ g/mL). Estes tubos foram incubados a 37 °C por cerca de 16 h, sob agitação de 180 rpm.

Por fim, os plasmídeos foram purificados utilizando-se o kit de purificação QIAGEN *Plasmid Midi* (Qiagen), de acordo com as instruções do fabricante e suspensos em 100 μ L de água estéril. Em seguida foi feita a dosagem por absorvância a 260 nm e conferido o padrão de pureza e qualidade das bandas em um gel de agarose a 1%, como descrito anteriormente (3.16.1).

As reações de sequenciamento foram realizadas utilizando-se 1 μ L de DNA (207 ng/ μ L), 5 μ L de água estéril, 2 μ L de BigDye, 1 μ L de tampão para BigDye, e 1 μ L de *primer* T7P ou 1 μ L de *primer* T7T. A reação foi realizada utilizando-se o seguinte programa: 96 °C por 1 min, seguido por 30 ciclos de (96 °C por 10 seg, 50 °C por 5 seg, 60 °C por 4 min). Os produtos das reações foram precipitados e suspensos em 3 μ L da solução *formamide loading dye* (Applied

Biosystems) e analisados em sequenciador automático de DNA modelo ABI 3130 (Applied Biosystems). Em seguida, as sequências obtidas foram analisadas.

Além da confirmação por sequenciamento de nucleotídeos, a amostra foi submetida à análise de restrição utilizando-se 1 μ L da enzima NCO I (Biolabs), 2 μ L de amostra contendo 1284 ng de pET28a+ γ BjPLI, acrescidos de 1 μ L de tampão para a enzima NCO I (10X) e 7 μ L de água estéril. Por fim, a solução foi incubada por 2 h e analisada em um gel de agarose 1%.

3.16.9. Transformação da cepa *SHuffle* de *E. coli* com o plasmídeo recombinante

pET28a+ γ BjPLI

Ao contrário das transformações anteriores, que haviam sido feitas por eletroporação, neste caso, a cepa *SHuffle* de *E. coli* foi transformada por choque-térmico. Sendo assim, uma alíquota de 200 μ L da cepa *SHuffle* que havia sido mantida no -80 °C, foi mantida por 15 min em banho de gelo. Em seguida, foi adicionado 1 μ L da reação de ligação contendo o plasmídeo recombinante de pET28a+ γ BjPLI (300 ng). Após uma gentil homogeneização a amostra foi incubada em banho de gelo por 30 min, depois, 1 min e 30 seg a 42 °C e, novamente, em banho de gelo por 2 min. Após essas incubações, foram adicionados 800 μ L de solução SOC e a reação foi mantida por mais 1 h a 37 °C sob agitação a 700 rpm. Por fim, a amostra foi plaqueada em placas de Petri contendo cerca de 20 mL de meio seletivo Luria-Bertani suplementado com antibiótico de seleção canamicina (para uma concentração final de 20 μ g/mL) e a placa foi incubada em estufa a 37 °C por cerca de 16 h.

3.17. Expressão heteróloga da proteína recombinante

Para realizar os testes de expressão foram feitos pré-inóculos das colônias resultantes da transformação de células da cepa *SHuffle* com o plasmídeo pET28a+ γ BjPLI, selecionado em meio sólido com canamicina. As colônias foram inoculadas, individualmente, em 3 mL de meio LB líquido contendo 20 μ g/mL de canamicina e crescidas por cerca de 16 h a 37 °C.

Em seguida, as culturas crescidas foram diluídas na proporção 1:20 em meio LB líquido contendo 20 μ g/mL de canamicina, e crescidas novamente até alcançar a absorbância de 600 nm de aproximadamente 0,6. Quando o crescimento necessário foi atingido, uma alíquota de 1 mL foi retirada para ser mantida como controle negativo (amostra não induzida), e outras duas amostras, de 1 mL cada, foram induzidas com isopropiltiogalactosídeo (IPTG) nas concentrações finais de 0,1 mM e 0,4 mM. Em seguida, as amostras nas três condições foram

mantidas a 22 °C por 16 h a 180 rpm. Por fim, as amostras foram centrifugadas a 12000 rpm por 3 min, o sobrenadante foi descartado e uma alíquota do *pellet* foi submetida a eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % em tampão com condições reduzidas (**seção 3.5.**).

3.18. Análise de solubilidade

O restante das amostras (induzidas ou não) foram resuspendidas em tampão Tris -HCl 100 mM pH 8,0 NaCl 300 mM ou Tris -HCl 100 mM pH 8,0 NaCl 300 mM Ureia 6 M. Em seguida, a lise das células foi provocada por choque-térmico, ao fazer 4 ciclos de incubações (3 min em banho de gelo e 3 min a 42 °C). As amostras foram então, novamente, centrifugadas a 12000 rpm por 5 min e as alíquotas do *pellet* (fração insolúvel) e do sobrenadante (fração solúvel) foram submetidos a uma nova eletroforese em gel de poliacrilamida 15 % em tampão com condições reduzidas (**seção 3.5.**).

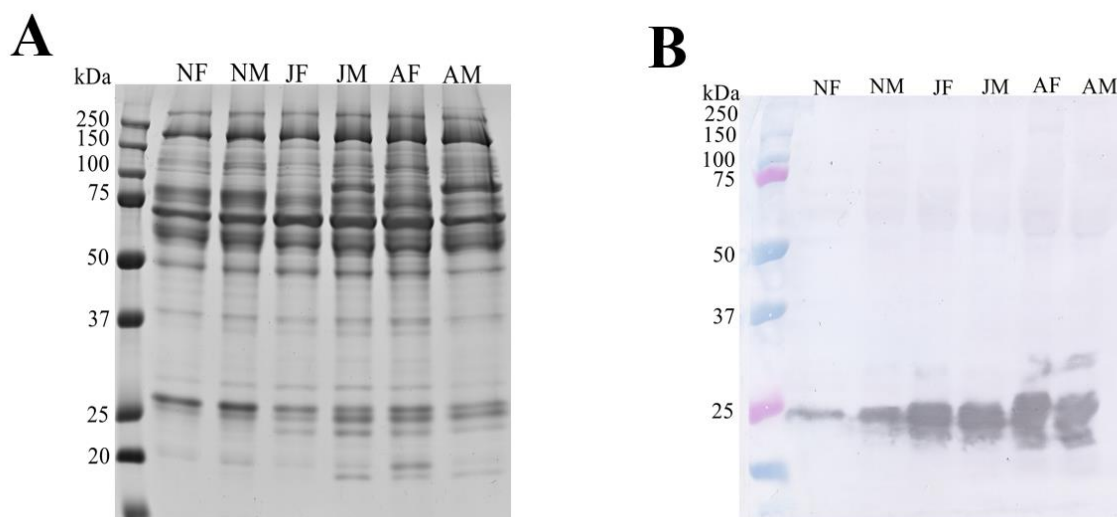
4. Resultados

Neste estudo, a variabilidade ontogenética e sexual de inibidores de venenos na composição plasmática de serpentes *B. jararaca* foi analisada utilizando 90 espécimes (**Tabela 1**). Esses espécimes foram classificados de acordo com a idade em três grupos (neonatos, jovens e adultos) e subdivididos por sexo (fêmeas e machos). As amostras de neonatos são *pools* de plasma de irmãos com 2 dias de vida de uma mesma ninhada, os espécimes jovens têm entre 16 e 20 meses de idade e, embora não seja possível especificar a idade dos adultos, foram usados espécimes em cativeiro por mais de 21 meses. É importante destacar que, embora tenham sido utilizados espécimes de diferentes localidades (São Paulo, Santa Catarina, Minas Gerais e Rio Grande do Sul), ao relacionar os resultados obtidos com as localizações de cada serpente, não foi observada nenhuma relação dos resultados apresentados a seguir com a variabilidade geográfica.

4.1. SDS-PAGE e Western blotting

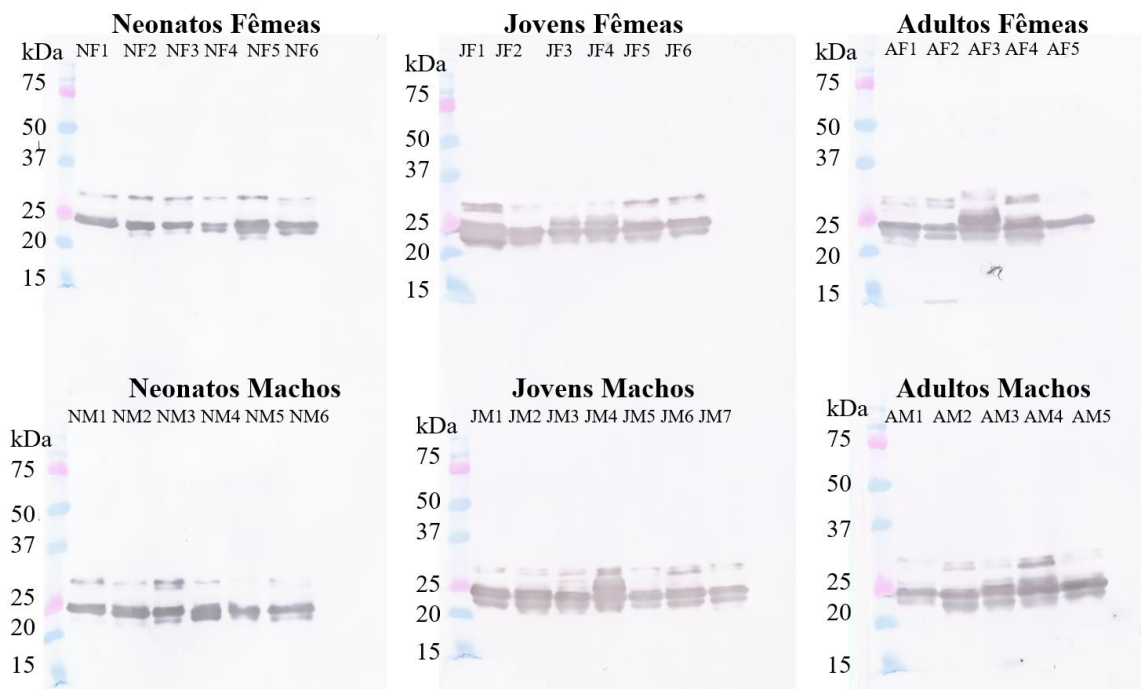
Para que fosse analisado o padrão da composição proteica geral do plasma de cada amostra bem como das proteínas capazes de se ligar às proteínas do veneno, primeiramente, os perfis proteicos individuais e dos *pools* de plasma foram avaliados por SDS-PAGE 15%. Segundo o perfil eletroforético, todas as amostras apresentaram uma composição complexa de proteínas (**Figura 4A**), com maior número de bandas de alta massa molecular entre 50 e 200 kDa, além de algumas bandas de baixa massa molecular, com aproximadamente 25 kDa. Logo em seguida, foi feita uma análise de reconhecimento das amostras individuais e em *pools* por *Western blotting*, para investigar quais bandas dos *pools* de plasma submetidas ao SDS-PAGE interagem com proteínas do veneno de *B. jararaca*.

Figura 4 - SDS-PAGE e Western blotting das proteínas dos pools de plasma de *B. jararaca* reconhecidas pelo veneno de *B. jararaca*. **A.** SDS-PAGE 15% com 20 µg de cada amostra de *pool* de plasma. **B.** Reconhecimento de *pools* de plasma por *Western blotting*. Após a transferência das proteínas plasmáticas para uma membrana de PVDF, esta foi sensibilizada com 40 µg de veneno de *B. jararaca*, incubada com soro antibotrópico (1:1000), e em seguida incubada com anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase (1:10.000). A revelação foi feita usando um substrato cromogênico (3,3'diaminobenzidine (tetrahydrochloride)). Neonatos fêmeas (NF), neonato machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM). Marcador molecular Dual Color (Bio-Rad).



A análise do perfil de reconhecimento, por *Western blotting*, apresentou bandas com massa em torno de 25 kDa. Além disso, na figura referente aos *pools* (**Figura 4B**), nota-se um aumento considerável no número de bandas e intensidades de acordo com o aumento da idade em ambos os sexos. Também pode ser vista, além da banda de 25 kDa em todos os grupos, uma banda de ~24 kDa no grupo jovem e duas bandas de (~24 kDa e ~30 kDa) no grupo adulto (**Figura 4B**). Porém, estranhamente, o aumento de intensidade das bandas de 25 kDa não foi observado no perfil de reconhecimento das amostras individuais (**Figura 5**). Além disso, a banda de ~30 kDa também está presente em algumas amostras de neonatos e indivíduos jovens (**Figura 5**).

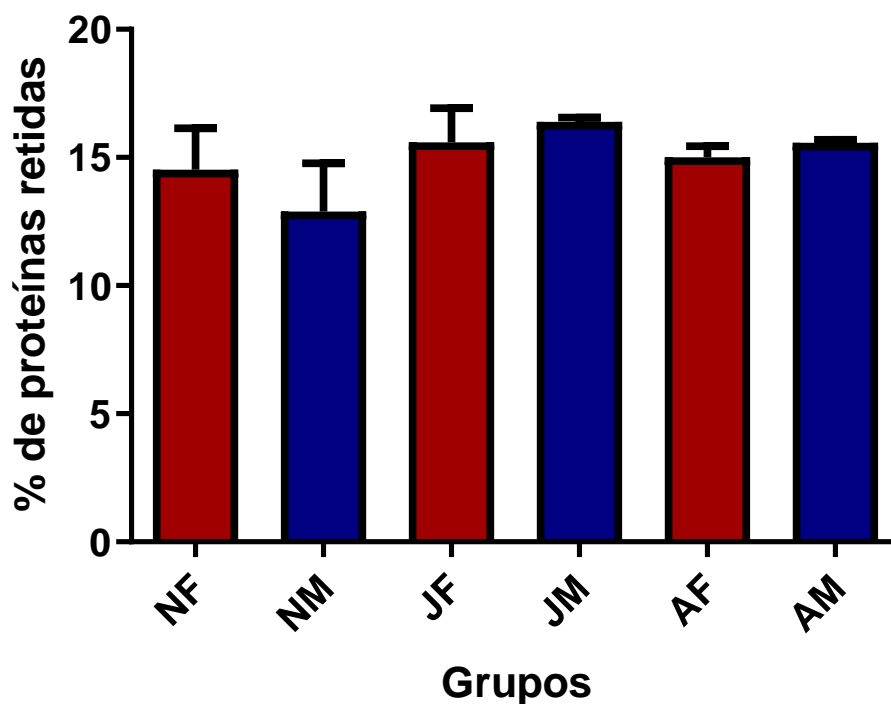
Figura 5 - Western blotting de amostras individuais de proteínas do plasma de *B. jararaca* reconhecidas pelo veneno de *B. jararaca*. Vinte μg de amostras individuais dos plasmas foram aplicados em SDS-PAGE 15% e transferidos para uma membrana de PVDF. Em seguida a membrana foi sensibilizada com 40 μg de veneno de *B. jararaca*, incubada com anticorpo antibotrópico (1: 1.000) e com anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase (1:10.000). A reação de revelação foi feita usando um substrato cromogênico (3,3'diaminobenzidine (tetrahydrochloride). Marcador molecular Dual Color (Bio-Rad).



4.2. Cromatografia de afinidade

Por meio de uma cromatografia de afinidade, na qual o veneno de *B. jararaca* foi acoplado à resina, foram recuperadas proteínas plasmáticas que tinham afinidade com o veneno. Essa análise foi feita com o *pool* dos plasmas, devido à quantidade de amostra necessária para a execução do experimento. E após quantificar a proteína total eluída da coluna (**Figura 6**), foi observado que todas as amostras analisadas possuem proteínas com capacidade de interagir com a proteínas presentes no veneno de *B. jararaca*, porém não houve diferença estatística significativa entre os grupos.

Figura 6 – Porcentagem de proteínas que foram retidas e eluídas da cromatografia de afinidade. Foram aplicadas amostras dos *pools* de plasma de neonatos fêmeas (NF), neonatos machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM) em uma coluna de afinidade com o veneno de *B. jararaca* acoplado à resina. As proteínas adsorvidas às proteínas do veneno de *B. jararaca* acopladas à resina foram eluídas

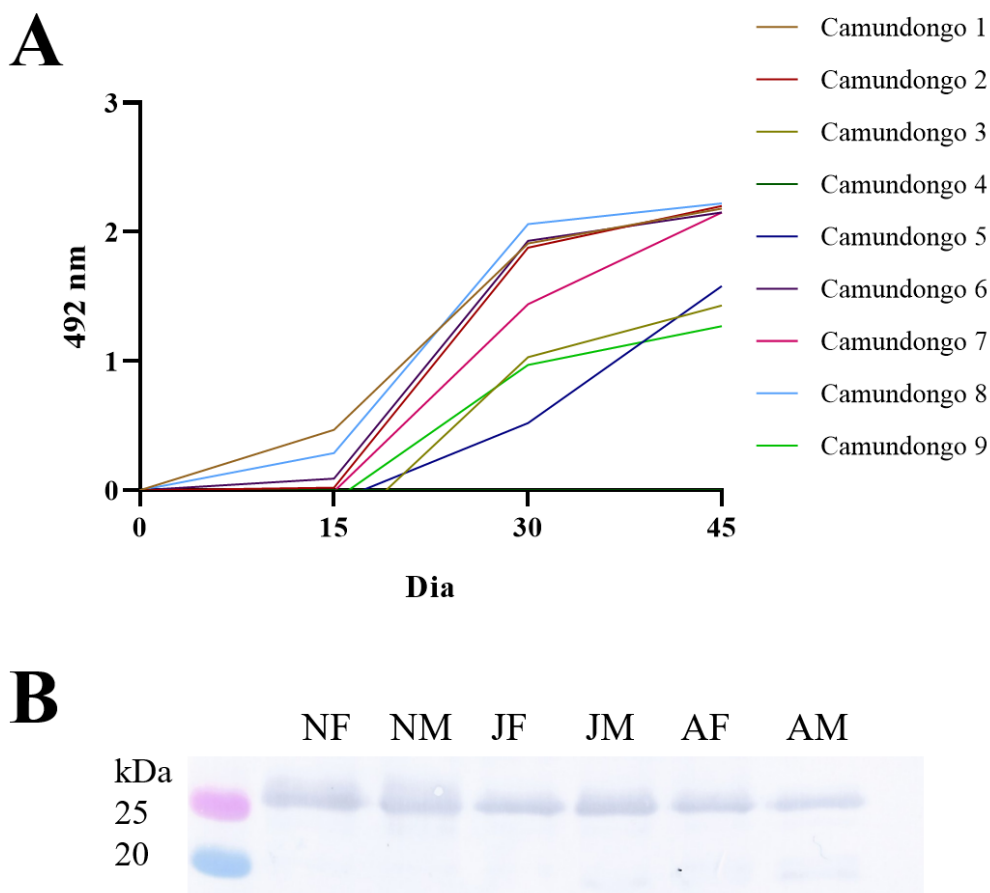


4.3. Quantificação de γ BjPLI no plasma

Com o objetivo de identificar se as proteínas que interagem com o veneno pertenciam ao grupo de PLIs, foi realizada a produção do anticorpo contra γ BjPLI (anti- γ BjPLI). Assim, o anticorpo foi produzido utilizando o γ BjPLI isolado injetado em 9 camundongos (**Figura 7A**). Após a terceira imunização (quadragésimo quinto dia), observou-se absorvâncias maiores que 1,2 (**Figura 7A**). Assim, foi feito um *pool* de soro dos 9 camundongos e os experimentos subsequentes foram então realizados, e o título de anticorpo foi de $10,6 \times 10^3$.

O imunorreconhecimento, por *Western blotting*, confirmou a presença de γ BjPLI nas amostras do *pool* (**Figura 7B**), ao apresentar a banda de 25 kDa do plasma sendo reconhecidas pelo soro dos camundongos contendo anticorpos contra o γ BjPLI. Como não foi possível perceber uma diferença visual nas intensidades das bandas, foi feita a quantificação do γ BjPLI nas amostras, por ELISA.

Figura 7 – Perfil individual da resposta imune dos camundongos ao γ BjPLI e imunorreconhecimento da banda de 25 kDa do plasma de *B. jararaca* pelas proteínas do pool do soro de camundongos. A. Perfil de resposta imune de camundongos imunizados com γ BjPLI. **B.** Imunorreconhecimento das proteínas dos pools de plasma por *Western blotting*. Vinte μ g de proteínas plasmáticas foram aplicadas em SDS-PAGE 15%. Após a transferência das proteínas para uma membrana de PVDF, esta foi sensibilizada com anti- γ BjPLI (1:1.000), incubada com anti-IgG de camundongo conjugada com peroxidase (1: 10000), e a reação foi revelada utilizando um substrato cromogênico (3,3-diaminobenzidina (tetrahydrocloro)). Neonatos fêmeas (NF), neonatos machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM). Marcador molecular Dual Color (Bio-Rad).

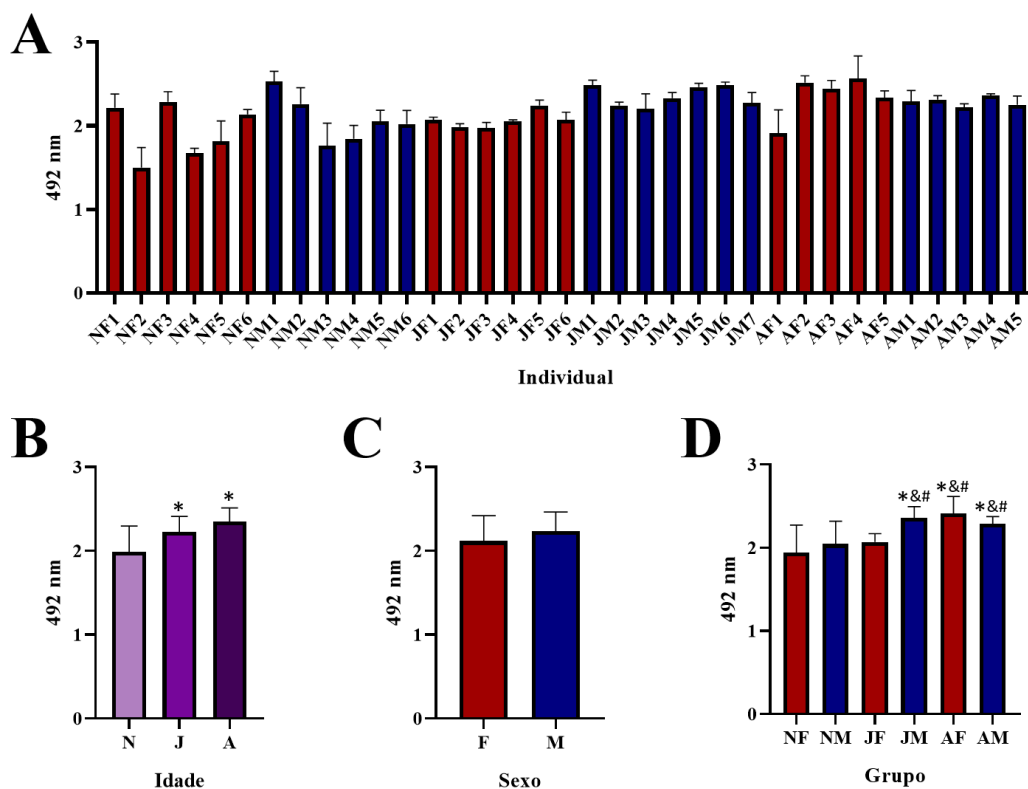


Através do ensaio ELISA, foi possível observar que há uma variabilidade nas absorbâncias do γ BjPLI das amostras individuais (**Figura 8A**), como por exemplo, nos grupos NF1 e NF3 (**Figura 8A**), que apresentaram absorbância de 2,2, valor maior que 1,9 que foi apresentado pela média do grupo de neonatos do sexo feminino (**Figura 8D**) ou NM1 e NM2 (**Figura 8A**) que apresentaram absorbâncias de 2,5 e 2,2, respectivamente, valores maiores quando comparados com as demais amostras individuais no grupo de machos neonatos.

Além disso, é possível observar uma tendência de aumento da concentração de γ BjPLI com a idade dos animais (**Figura 8B**). De acordo com o ELISA das amostras separadas por

idade, há diferença estatística significativa entre os grupos de jovens e adultos em relação aos neonatos (**Figura 8B**). Por outro lado, em uma análise geral das amostras divididas apenas por sexo (**Figura 8C**), não houve diferença estatística entre fêmeas e machos. Por fim, quando comparados de acordo com a idade e sexo, mostra-se que existe diferença estatística entre NF, NM e JF em relação ao JM, AF e AM, o que sugere que os jovens machos atingem maior concentração de γ BjPLI no plasma quando comparados com as jovens fêmeas (**Figura 8D**).

Figura 8 - Dosagem de γ BjPLI por ELISA. **A.** Imunorreconhecimento individual de amostras de plasma por anti- γ BjPLI. Os dados foram expressos como média \pm DP, n = 3. **B.** Imunorreconhecimento de amostras de plasma por anti- γ BjPLI classificado por idade. Neonatos (N), jovens (J) e adultos (A). * Indica uma diferença estatisticamente significativa em relação ao recém-nascido (n = 3, p <0,0001, ANOVA, teste de comparações múltiplas de Tukey). **C.** Imunorreconhecimento de amostras de plasma por anti- γ BjPLI classificadas por sexo. Feminino (F) e masculino (M). **D.** Imunorreconhecimento de amostras de plasma por anti- γ BjPLI classificadas por grupo. * Indica uma diferença estatisticamente significativa de NF (p <0,0001, ANOVA, teste de comparações múltiplas de Tukey), & indica uma diferença estatisticamente significativa de NM (p <0,01, ANOVA, teste de comparações múltiplas de Tukey) e # indica uma diferença estatisticamente significativa de JF (p <0,04, ANOVA, teste de comparações múltiplas de Tukey). Neonatos fêmeas (NF), neonatos machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM).



4.4. *Análise proteômica do plasma por espectrometria de massas*

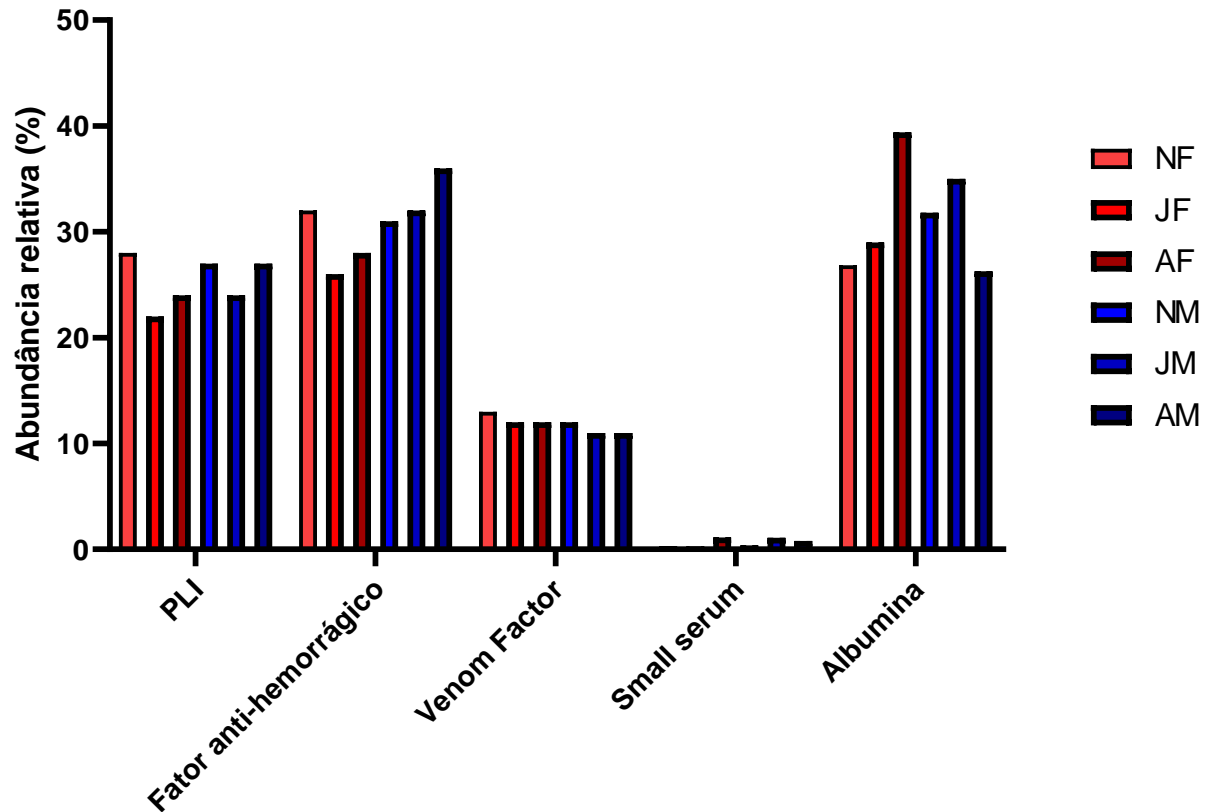
A análise proteômica foi realizada com amostras brutas do *pool* de plasma de cada um dos seis grupos de *B. jararaca* (NF, NM, JF, JM, AF e AM). Devido ao baixo número de proteínas do plasma de serpentes depositadas em banco de dados, foram identificadas apenas 18 proteínas plasmáticas de 6 grupos diferentes (**Tabela 2**). Dentre as proteínas identificadas, 6 foram identificadas como proteínas da família dos PLIs, 3 proteínas anti-hemorrágicas, 4 proteínas descritas como “*Venom factor*”, 2 proteínas da família das “*Small serum proteins*” e 3 albuminas. De acordo com a abundância relativa de proteínas, representada na **Figura 9**, as albuminas (26-39%) e os fatores anti-hemorrágicos (26-36%) foram as proteínas mais abundantes, seguidas pelos PLI (22-28%) e “*Venom factor*” (11-13%), e, por fim, as “*Small serum proteins*” (0,2-1,1%).

Apesar de haver um aumento nas concentrações de proteínas, como nos fatores anti-hemorrágicos apresentado pelos machos (NF 32%, JF 26%, AF 28%, NM 31%, JM 32% e AM 36%; **Figura 9**), essas diferenças, quando comparadas de acordo com o sexo ou a idade dos animais em cada *pool*, não foram maiores que 8%.

Tabela 2 – Lista de proteínas identificadas por espectrometria de massas no plasma de serpentes da espécie.

Número de acesso	Classe	Número de peptídeos	Peptídeos únicos	Massa (kDa)	Descrição
B1A4M7 PLI_BOTAL	α PLI	14	1	18,4	<i>Phospholipase A2 inhibitor OS=B. alternatus</i>
B1A4N8 PLI_BOTJA	α PLI	25	12	18,3	<i>Phospholipase A2 inhibitor OS=B. jararaca</i>
B1A4P7 PLI4_BOTMO	α PLI	7	2	18,4	<i>Phospholipase A2 inhibitor clone 04 OS=B. moojeni</i>
tr A0A481S6S6 A0A481S6S6_BOTJA	β PLI	5	5	37,3	<i>Phospholipase A2 inhibitor OS=B. jararaca</i>
tr A8I4L6 A8I4L6_BOTJA	γ PLI	38	30	22,0	<i>Phospholipase A2 inhibitor OS=B. jararaca</i>
Q7LZI1 PLIB_NAJKA	γ PLI	6	1	20,4	<i>Phospholipase A2 inhibitor OS=Naja kaouthia</i>
Q5KQS2 FETCB_GLOBR	-	11	7	38,5	<i>Antihemorrhagic factor cHLP-B OS=Gloydius brevicaudus</i>
Q5KQS4 FETC_GLOBR	-	8	2	36,6	<i>Antihemorrhagic factor cMSF OS=Gloydius brevicaudus</i>
Q9DGI0 FTE46_BOTJA	-	40	36	38,7	<i>Antihemorrhagic factor Bj46a OS=B. jararaca</i>
A0RZC6 VCO32_AUSSU	-	16	5	184,5	<i>A.superbus venom factor 2 OS=Austrelaps superbis</i>
Q91132 VCO3_NAJKA	-	10	1	184,5	<i>Cobra venom factor OS=Naja kaouthia</i>
I2C090 VCO3_OPHHA	-	18	1	183,9	<i>Ophiophagus venom factor OS=Ophiophagus hannah</i>
J3S836 VCO3_CROAD	-	71	48	184,9	<i>Venom factor OS=Crotalus adamanteus</i>
tr D9N567 D9N567_GLOBB	-	2	1	12,1	<i>Small serum protein-1 OS=Gloydius blomhoffii blomhoffii</i>
tr D9N568 D9N568_GLOBB	-	2	1	12,4	<i>Small serum protein-2 OS=Gloydius blomhoffii blomhoffii</i>
tr Q5NTZ2 Q5NTZ2_PROFL	-	43	36	69,7	<i>Serum albumin OS=ProtoB. flavoviridis</i>
tr A0A6P9CGQ0 A0A6P9CGQ0_PANGU	-	15	10	69,5	<i>Serum albumin-like OS=Pantherophis guttatus</i>
tr Q91134 Q91134_NAJNA	-	2	2	69,7	<i>Cobra serum albumin OS=Naja naja</i>

Figura 9 - Abundância relativa das famílias de proteínas dos pools de plasmas de serpentes da espécie *B. jararaca* identificadas por espectrometria de massas. A abundância relativa foi calculada com base nas intensidades das proteínas individuais identificadas pela análise proteômica. Neonatos fêmeas (NF), neonatos machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM).



Em relação aos PLIs, através dessa análise proteômica, foi possível identificar os inibidores das três classes (α PLI, β PLI e γ PLI). Embora o inibidor do tipo γ já tivesse sido identificado e isolado, é a primeira vez que as proteínas do tipo α e β são identificadas no plasma de serpentes da espécie *B. jararaca* (Tabela 2).

Foram identificadas três sequências descritas como α PLI, sendo elas a B1A4M7 de *B. alternatus*, a B1A4N8 de *B. jararaca* e a B1A4P7 de *B. moojeni*, todas com cerca de 18 kDa e com sequência de aminoácidos similares (Tabela 2 e Figura 10). A sequência destes α PLI depositadas no banco de dados são provenientes de estudos de transcriptoma do fígado de serpentes e possuem cerca de 166 aminoácidos, sendo os 19 primeiros referentes ao peptídeo sinal que não está presente na proteína madura.

Comparando as três sequências (Figura 10), pode ser observado que das 14 trocas de aminoácidos, apenas 3 representam uma alteração nas propriedades de cada aminoácido. Dentre as três sequências identificadas (B1A4M7, B1A4N8 e B1A4P7), a B1A4N8 é a que possui

maior cobertura de peptídeos identificados (**Tabela 2**). Além disso, esta foi a sequência de α PLI mais abundante, com valores entre 6% em NF e 10% em AM. Por outro lado, B1A4P7 de *B. moojeni* teve abundância relativa entre 0,01% em AM e 2% em AF, enquanto B1A4M7 de *B. alternatus* não foi identificado em JF, JM e AM e nos outros grupos em que foi identificado sua abundância relativa chegou apenas a 0,04%.

Apenas uma sequência de 37 kDa, referente ao PLI da classe β , foi identificada, correspondente ao número de acesso A0A481S6S6 (**Tabela 2**). Esta sequência possui cerca de 311 aminoácidos, sendo os 21 primeiros o peptídeo sinal, de acordo com a análise feita pelo SignalP 5.0 (ALMAGRO ARMENTEROS et al., 2019).

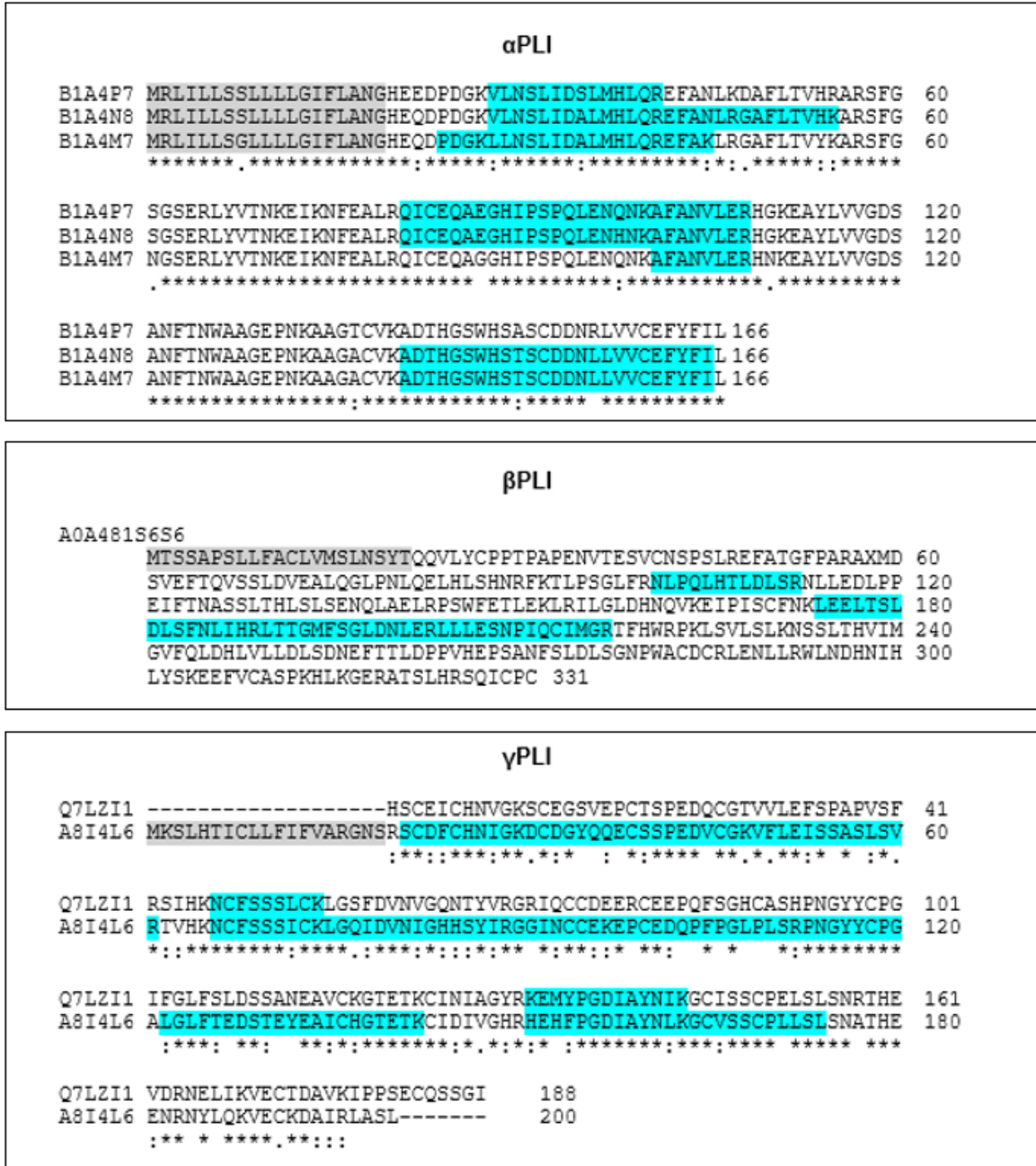
Os 5 peptídeos identificados na análise proteômica representam 19% da cobertura da proteína madura depositada no banco de dados (**Figura 10**). Dos 310 aminoácidos da proteína madura, 56 são leucinas que corresponde a 26% da composição da estrutura. Dentre os peptídeos reconhecidos pela análise de espectrometria de massas, pode-se detectar 15 leucinas. Estes dados corroboram a literatura, em que os β PLI são caracterizados principalmente pela abundância de leucinas na sua composição.

Na primeira região, com peptídeos identificados entre os aminoácidos 100 e 114, e na segunda região, compreendendo dos aminoácidos 173 ao 218, estão conservados o segundo, o quinto e o sexto motivo estrutural rico em leucina, respectivamente. Ao todo, existem oito motivos estruturais em β PLI, compostos por LXXLXLXXNXL (FORTES-DIAS et al., 2019). Três destes motivos estruturais estão presente entre os peptídeos identificados, sendo que o segundo motivo é encontrado na primeira região, com peptídeos identificados entre os aminoácidos 100 e 114, e o quinto e sexto motivo estão presentes na segunda região, compreendendo dos aminoácidos 173 ao 218. (FORTES-DIAS et al., 2019).

Em relação ao inibidor do tipo γ , foram identificadas duas sequências no banco de dados, a A8I4L6 de *B. jararaca* e a Q7LZII de *Naja kaouthia*, sendo a primeira com massa de 22 kDa e a segunda com massa de 20 kDa (**Tabela 2**). A sequência proveniente de *B. jararaca* depositada no banco de dados possui 200 aminoácidos, sendo os primeiros 19 referentes ao peptídeo sinal. Assim, a proteína madura teria 181 aminoácidos dos quais 125 foram identificados pelos peptídeos adquiridos na análise de espectrometria de massas, correspondendo a uma cobertura de 81%. Por outro lado, a sequência da proteína madura de *Naja kaouthia* possui 188 aminoácidos e apenas 26 foram identificados, correspondendo a uma

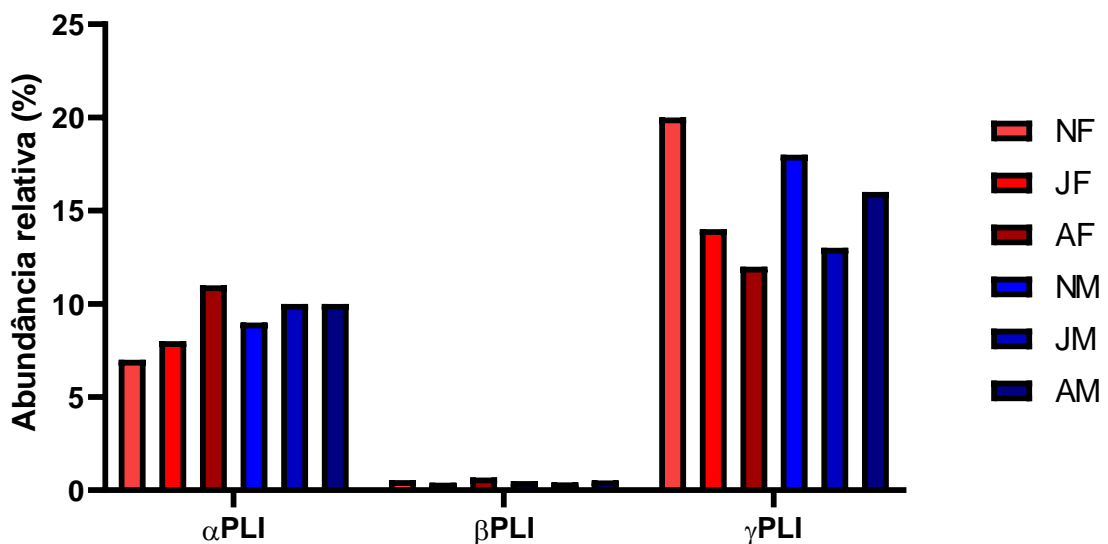
cobertura de 18%. Estes valores implicaram na taxa de confiança, sendo que a de *B. jararaca* refletiu um valor maior do que a da *Naja kaouthia*. Ainda comparando as duas sequências, segundo o alinhamento (**Figura 10**), há alteração em muitos aminoácidos. Apenas nas regiões em que os peptídeos foram identificados, há alteração em três aminoácidos (H por K, H por M e F por Y). A análise de abundância relativa mostrou também que as duas sequências foram encontradas em todos os grupos analisados, porém a A8I4L6 de *B. jararaca* representa de 10% (AF) a 17% (NF) enquanto a Q7LZI1 de *Naja kaouthia* apresentou valores entre 1,8% (JM) e 2,4% (NF).

Figura 10 - Alinhamento da sequência de aminoácidos dos PLI identificados. O alinhamento foi feito utilizando o Clustal Omega. O símbolo (*) indica os resíduos de aminoácidos iguais entre as sequências; (:.) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza igual, (.) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza diferente. O peptídeo sinal foi predito utilizando o programa SignalP 5.0 e está destacado em cinza. Em ciano estão destacados os peptídeos identificados por espectrometria de massas. B1A4M7 (B. alternatus), B1A4N8 (B. jararaca), B1A4P7 (B. moojeni), A0A481S6S6 (B. jararaca), A8I4L6 (B. jararaca) e Q7LZI1 (Naja kaouthia).



A diferença na abundância relativa de cada classe de PLI presente no plasma pode ser observada na **Figura 11**, na qual o inibidor do tipo γ apresenta uma maior abundância em relação aos outros, com valores de 12% (AF) a 20% (NF), enquanto os do tipo α representam de 7% (NF) a 10% (AF) e os do tipo β apresentam uma porcentagem menor, com valores entre 0,4% e 0,7%. Embora haja uma tendência visual no aumento na abundância de α PLI conforme a idade e sexo, e uma aparente diminuição na abundância de γ PLI, conforme esses mesmos parâmetros, não houve diferença significativa na estatística de nenhuma das classes de PLI.

Figura 11 - Abundância relativa das classes de PLIs presentes nos pools de plasmas de serpentes da espécie *B. jararaca* identificadas por espectrometria de massas. A abundância relativa foi calculada com base nas intensidades das proteínas individuais identificadas pela análise proteômica. Neonatos fêmeas (NF), neonatos machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM).



Outro grupo de proteínas que tem sido descrito na literatura com função protetora em relação às atividades dos venenos são os fatores anti-hemorrágicos (AOKI et al., 2008; VALENTE et al., 2001). Estes fatores anti-hemorrágicos presentes no plasma de animais peçonhentos também são conhecidos como inibidores de metaloproteases. Durante a análise proteômica do plasma dos grupos estudados, foram identificadas três sequências correspondentes a esses fatores anti-hemorrágicos, sendo elas a Q5KQS2 (cHLP-B) e Q5KQS4 (cMSF) de *Gloydius brevicaudus*, que possuem massa de 38 kDa e 36 kDa respectivamente, e Q9DGI0 (Bj46a) de *B. jararaca*, que possui 38 kDa (**Tabela 2**).

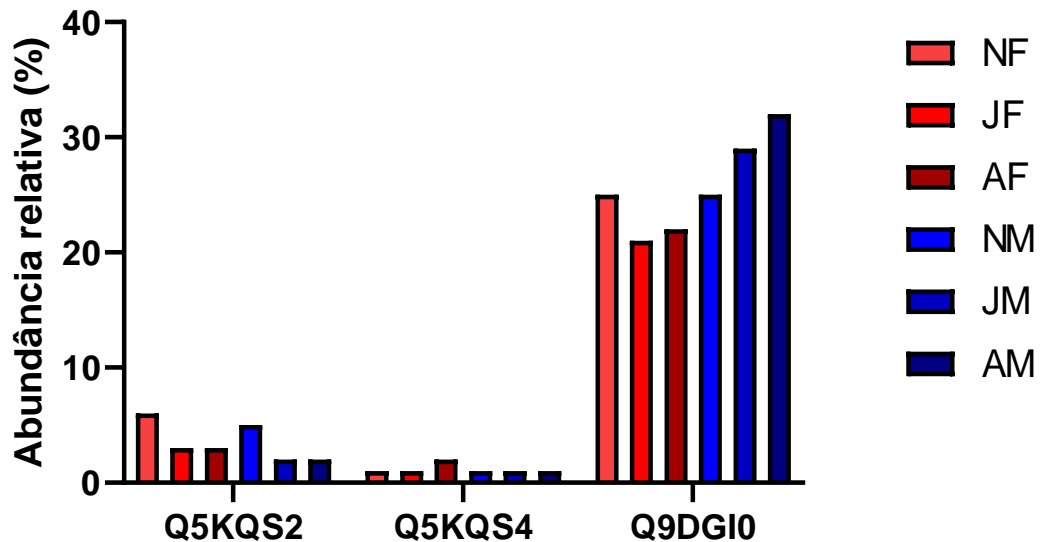
O alinhamento das três estruturas primárias (MADEIRA et al., 2019), mostrou que 60% da sequência de aminoácido é conservada nas três proteínas (**Figura 12**). A Q9DGI0 (Bj46a) de *B. jararaca* foi a que teve maior cobertura de peptídeos identificados, com cerca de 47%,

seguida por Q5KQS4 (19%) e Q5KQS2 (16%). Este mesmo padrão foi seguido pela porcentagem da abundância relativa de cada uma, sendo que Q9DGI0 (Bj46a) obteve valores entre 21 e 24%, Q5KQS2 entre 2 e 6% e Q5KQS4 entre 1,2 e 2,6% (**Figura 13**), resultados os quais corroboram o identificado por transcriptoma, no qual foi demonstrado que não há diferença ontogenética na abundância de Bj46a (GOMES et al., 2017).

Figura 12 - Alinhamento da sequência de aminoácidos dos fatores anti-hemorrágicos identificados. O alinhamento foi feito utilizando o Clustal Omega. O símbolo (*) indica os resíduos de aminoácidos iguais entre as sequências; (:) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza igual, (.) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza diferente. O peptídeo sinal foi predito utilizando o programa SignalP 5.0 e está destacado em cinza. Em ciano estão destacados os peptídeos identificados por espectrometria de massas. Q5KQS2 e Q5KQS4 (*Gloydus brevicaudus*), e Q9DGI0 (*B. jararaca*).

Fator anti-hemorrágico		
Q5KQS2	MNSLVALVLLGQMIGSTLSHHLQSHVDCNGEDA	60
Q5KQS4	MHFLVALVLLGQIIIGSTLSSQVRGDLECNDR	60
Q9DGI0	MNSLVALVLLGQIIIGSTLSSQVRGDLECKDA	60
	*: *****:***** :.:.:.*: .:.*:.*: * .*:*****:** ** .:****:	
Q5KQS2	EIHVLPRRPRGKIIILELKLLETECHVLDPT	119
Q5KQS4	NIVVVPWNGDLVAVFLKLNLLLETECHVLDPT	120
Q9DGI0	NIVVVPWDGDWVAVFLKLNLLLETECHVLDPT	120
	:* **:* :.:.:.*:*****:***:** : **** **,*:*:.:	
Q5KQS2	VDKVIGAKCHSDPDSVEDVRRNCPKCPILLPL	179
Q5KQS4	FKQDVFVKCHSTPDSVEDVRRNCLKCPILLSP	180
Q9DGI0	FKEDVFAKCHSTPDSVENVRRNCPKCPILLSP	180
	..: : .**** *****:***** ***** :.:.:*****:***,*****	
Q5KQS2	EISRGQHKYEPEAFYVEFAIVEVNCTAQEAH	239
Q5KQS4	EISRGQHKYEPEAFYVEFAIVEVNCTAQEAH	240
Q9DGI0	EISRGQHKYEPAYYVEFAIVEVNCTAQLHDD	240
	*****:***** *****:***:**:*****	
Q5KQS2	LEKPKDEQFESDCVIFDVKEGHAHSHLIEHH	299
Q5KQS4	LEKPKHENFESDCVILDVKEGHAHSHLIEHH	284
Q9DGI0	LEKPKDEQFESDCVILHVKEGHAHSHLIQQH	300
	*****.*:*****:*****:***: : . ** :*.*	
Q5KQS2	SHSHEHVAEVPVAVAKREVPTNTPHDHTHP	342
Q5KQS4	---VECVAECPVAFVNKEVPTDISDRHTTP	324
Q9DGI0	S--HEHLAEVPVAFVKKELPKDISDRHTTP	341
	* ** ***.:.:***: : . ** *** *****: **:	

Figura 13 - Abundância relativa de proteínas descritas como fatores anti-hemorrágicos presentes nos *pools* de plasmas de serpentes da espécie *B. jararaca* identificadas por espectrometria de massas. A abundância relativa foi calculada com base nas intensidades das proteínas individuais identificadas pela análise proteômica. Neonatos fêmeas (NF), neonatos machos (NM), jovens fêmeas (JF), jovens machos (JM), adultos fêmeas (AF) e adultos machos (AM).



4.5. Análise da inibição da atividade anticoagulante da crotoxina

Sabendo-se que a crotoxina possui um papel anticoagulante importante durante o envenenamento, sua atividade anticoagulante foi desafiada utilizando-se o γ BjPLI isolado. Para isso, foi empregado o método de tromboelastometria rotacional, no qual vários parâmetros relacionados à coagulação podem ser mensurados através da detecção eletromecânica, por meio de um sensor óptico ligado ao pino suspenso, que fica em constante rotação na cubeta com a amostra.

Neste trabalho, foi utilizado o método INTEM que avalia apenas a via intrínseca da coagulação, acessando a formação do coágulo e a polimerização de fibrina e o TC foi avaliado. Sendo assim, foi verificado que o tempo normal de coagulação, quando o plasma foi ativado pela adição do ácido elágico (controle), foi de $738,6 \text{ s} \pm 50,33 \text{ s}$. Por outro lado, a crotoxina, na dose de 100 ng, foi capaz de prolongar o tempo de coagulação do plasma para $1601,0 \text{ s} \pm 134,7$, e, ao pré-incubar 100 ng de crotoxina com 500 ng de γ BjPLI, o tempo de coagulação diminuiu para $901,6 \text{ s} \pm 103,1 \text{ s}$. Estas alterações no tempo de coagulação demonstram que o γ BjPLI possui atividade inibitória, com capacidade de inibir 82% da atividade anticoagulante da crotoxina. Mesmo o γ BjPLI sendo uma proteína plasmática, a incubação dele com o plasma

mostrou que ele não possui um papel na coagulação, apresentando TC de $643,5 \text{ s} \pm 74,5 \text{ s}$ (Figura 14 e 15).

Figura 14 - Modelo do perfil tromboelastométrico adquirido durante um dos experimentos. A. Perfil do grupo controle (Grupo 2) contendo plasma recalcificado de galinha tratado apenas com ácido elágico (TC: 737 s); B. Perfil do Grupo 5 contendo 500 ng de γ BjPLI (TC: 569 s); C. Perfil do Grupo 3 contendo 100 ng de crotoxina (TC: 1953 s); D. Perfil do Grupo 4, teste de inibição incubando previamente 100 ng de crotoxina com 500 ng de γ BjPLI (TC: 1009 s). No eixo x encontra-se o tempo de formação do coágulo em segundos e em y a amplitude da firmeza do coágulo em milímetros.

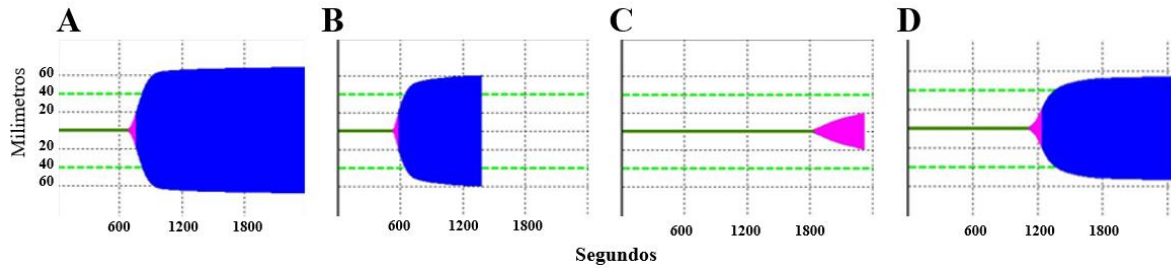
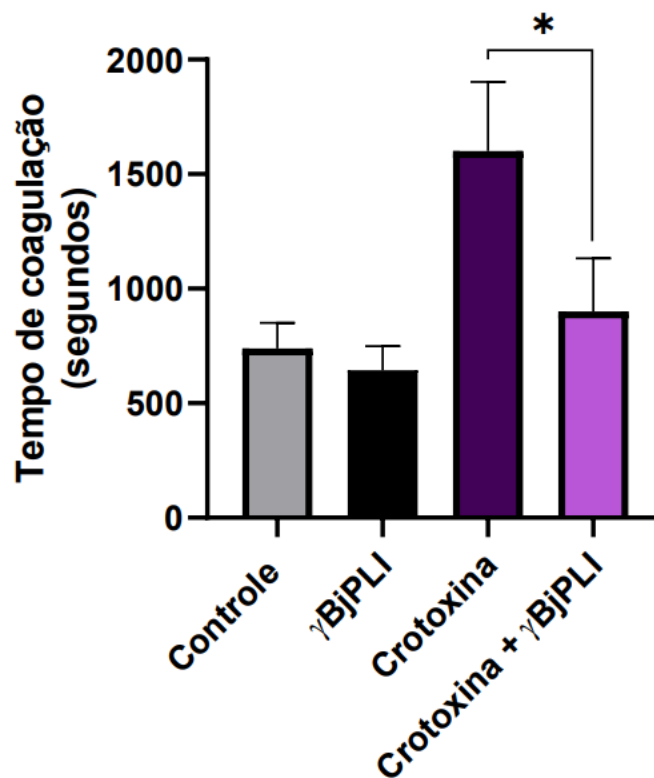


Figura 15 – Análise do tempo de coagulação. Tempo de coagulação (em seg) de acordo com o grupo testado: Controle (Grupo 2): plasma de galinha tratado apenas com ácido elágico; γ BjPLI (Grupo 5): plasma de galinha tratado com ácido elágico e 500 ng de γ BjPLI; crotoxina (Grupo 3): plasma de galinha tratado com ácido elágico e 100 ng de crotoxina; crotoxina + γ BjPLI (Grupo 4): plasma de galinha tratado com ácido elágico e 100 ng de crotoxina com 500 ng de γ BjPLI, previamente incubados (proporção molar de Ctx:PLI de 1:5,4). * indica uma diferença estatisticamente significativa em relação a crotoxina sozinha ($n=5$, $p < 0,001$, ANOVA, teste de comparações múltiplas de Tukey).

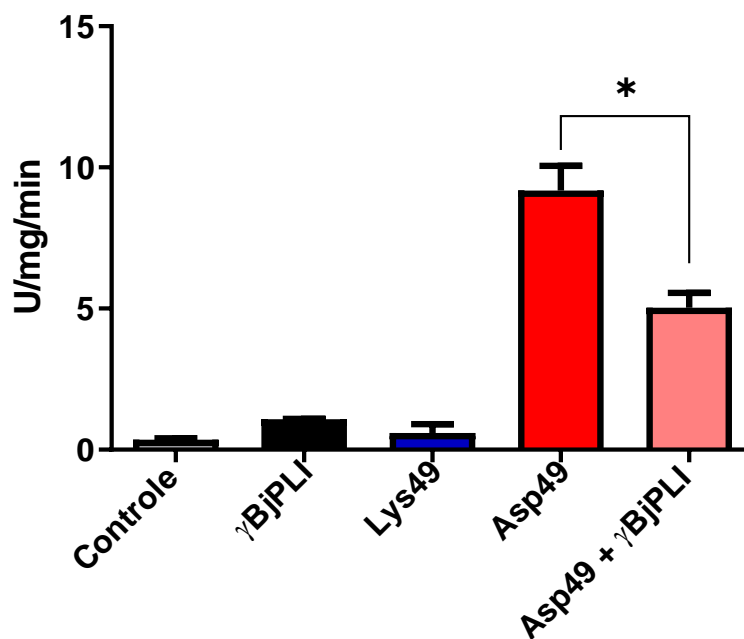


4.6. Inibição da atividade enzimática

A atividade enzimática da PLA₂ Lys-49 e da PLA₂ Asp-49 foram mensuradas através da utilização do substrato 4N3OBA e essas amostras apresentaram diferentes valores de atividade específica (**Figura 16**).

Os testes de inibição da atividade da PLA₂ evidenciaram a inibição promovida pelo γ BjPLI, chegando a inibir 47,49% da atividade da PLA₂ Asp-49, enzima cataliticamente ativa.

Figura 16 – Inibição da atividade enzimática da PLA₂ Lys-49 e da PLA₂ Asp-49 pelo γ BjPLI. Inibição da atividade da PLA₂ Asp-49 (20 μ g) utilizando o γ BjPLI (40 μ g) (proporção molar de PLA₂:PLI de 1:1,2), previamente incubado por 30 min. Controles: NaCl 0,85%, γ BjPLI (20 μ g), PLA₂ Asp-49 (20 μ g) e Lys-49 (20 μ g). O substrato utilizado foi o 4N3OBA (1 mg/mL) e a reação foi monitorada a 425 nm por 40 min e a atividade calculada e expressa em U/mg/min.

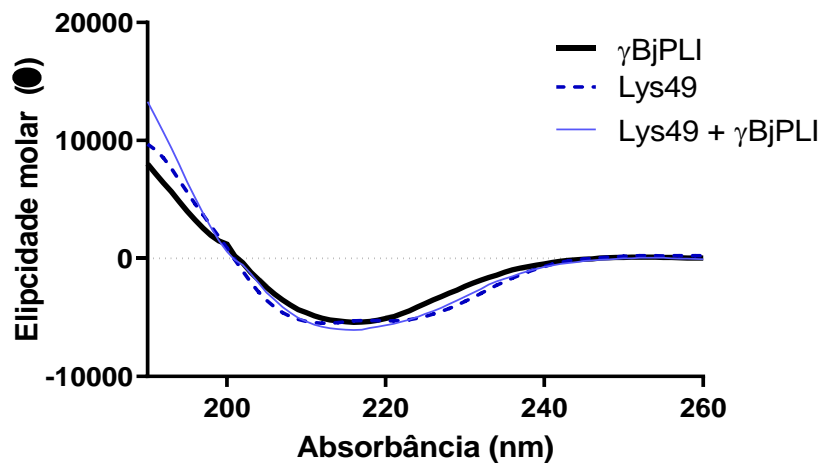


4.7. Estruturas secundárias

As porcentagens de estruturas secundárias, como alfa hélices, folhas beta, β -Turn e estruturas desordenadas foram analisadas por dicróismo circular. Nesta técnica foi utilizada a luz circulante polarizada na faixa do ultravioleta (UV) distante em todos os comprimentos de onda entre ~180 e 260 nm, permitindo analisar as estruturas do inibidor γ BjPLI, e das PLA₂ Asp-49 e Lys-49 isoladas e compará-las com os valores obtidos após incubação prévia.

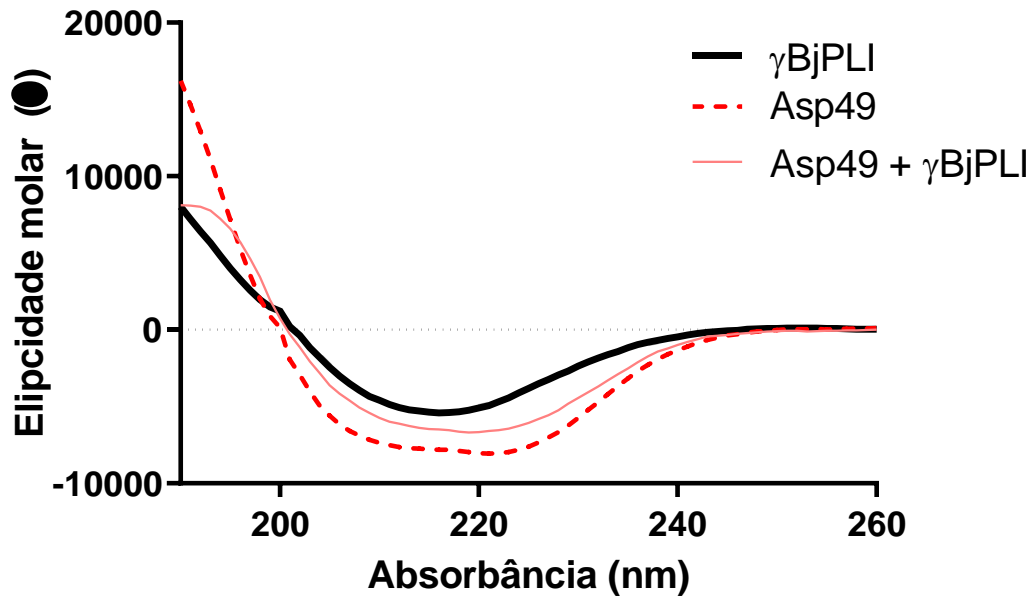
O espectro obtido de cada uma das amostras está representado nas **figuras 17 e 18** e as porcentagens das estruturas estão descritas na **tabela 3**. De acordo com o perfil do espectro de dicroísmo circular das amostras de γ BjPLI e a PLA₂ Lys-49 isoladas e pré-incubadas, não houve alterações nas porcentagens de estruturas secundárias resultante da interação entre PLA₂ e inibidor (**Figura 17**).

Figura 17 – Espectro obtido por dicroísmo circular de γ BjPLI, e PLA₂ Lys-49. Espectro do γ BjPLI (22 kDa), PLA₂ Lys-49 (13,7 kDa) e do incubado γ BjPLI + PLA₂ Lys-49 (proporção molar PLA₂:PLI de 1:0,6) obtido através da análise por dicroísmo circular referentes aos comprimentos de ondas entre 190 e 260 nm.



Por outro lado, na **figura 18**, a qual compara o espectro do γ BjPLI e PLA₂ Asp-49 pré-incubados com a de seus espectros isolados, é possível observar um distanciamento da linha das amostras incubadas em relação a das isoladas nos comprimentos de onda entre 200 e 240 nm, sugerindo que há uma modificação das estruturas secundárias do inibidor γ BjPLI e PLA₂ Asp-49 (pré-incubados) quando comparados com o perfil obtido por γ BjPLI e a PLA₂ Lys-49 isolados.

Figura 18 – Espectro obtido por dicroísmo circular de γ BjPLI, e PLA₂ Asp-49. Espectro do γ BjPLI (22 kDa), PLA₂ Asp-49 (14 kDa) e do incubado γ BjPLI + PLA₂ Asp-49 (proporção molar PLA₂:PLI de 1:0,6) obtido através da análise por dicroísmo circular referentes aos comprimentos de ondas entre 190 e 260 nm.



De acordo com as porcentagens descritas na **tabela 3**, houve uma diferença de 5% de folhas beta antiparalelas, e 3,5% de estruturas desordenadas e 3,2% de α -hélice nos resultados obtidos do γ BjPLI pré-incubado com PLA₂ Asp-49 em relação às porcentagens obtidas da PLA₂ Asp-49 isolada, enquanto a diferença de porcentagem de folhas beta antiparalelas e estruturas desordenadas foi de apenas 1,8 % e 1,20 %, respectivamente, do γ BjPLI pré-incubado com PLA₂ Lys-49 em relação à PLA₂ Lys-49 isolada.

Tabela 3 - Comparação da composição das estruturas secundárias do γ BjPLI, PLA₂ Asp-49 e Lys-49 isoladas e pré-incubadas, adquiridas por dicroísmo circular.

	γ BjPLI	Asp-49	Lys-49	Asp-49 + γ BjPLI	Lys-49 + γ BjPLI
α -hélice	21,5 %	26,9 %	24,5 %	23,7 %	23,4 %
Folhas β antiparalelas	18,9 %	16,3 %	20,1 %	21,3 %	21,9 %
Folhas β paralelas	11,3 %	9,6 %	10,4 %	10,8 %	10,8 %
β -Turn	19,5 %	18,2 %	18,7 %	18,9 %	18,9 %
Estruturas desordenadas	35,4 %	34,9 %	37,3 %	38,4 %	38,5 %
Total	118,7 %	105,9 %	111,0 %	113,1 %	113,5 %

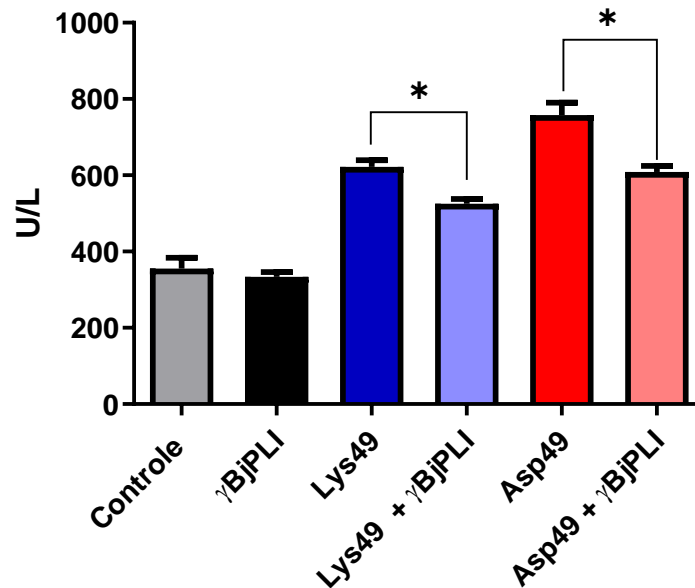
4.8. Inibição da atividade miotóxica

Para avaliar a capacidade do γ BjPLI inibir a atividade miotóxica provocada pelas PLA₂ Asp-49 e Lys-49, foi mensurada a quantidade de CK no plasma dos camundongos.

Ambas as PLA₂ provocaram uma ação tóxica nas células musculares, fazendo com que fosse liberado CK no plasma. A PLA₂ Asp-49 (10 μ g) teve uma atividade miotóxica maior que a PLA₂ Lys-49 (10 μ g), liberando 757,7 U/L \pm 32,42 U/L e 622,2 U/L \pm 17,02 U/L, respectivamente. No entanto, a incubação prévia do γ BjPLI (20 μ g) com a PLA₂ Lys-49 (10 μ g) ou com a PLA₂ Asp-49 (10 μ g) provocaram a redução do dano provocado por ambas PLA₂. No primeiro caso, a quantidade de CK sérica reduziu para 525,7 U/L \pm 12,19 U/L e no segundo caso, reduziu para 608 U/L \pm 15,6 U/L. Pode-se observar que o γ BjPLI possui uma melhor capacidade de inibir a atividade miotóxica provocada pela PLA₂ Asp-49 em relação a PLA₂ Lys-49, inibindo 19,6% e 15,5%, respectivamente.

Cabe ressaltar que o grupo correspondente ao γ BjPLI isolado (20 μ g) apresentou 333,5 U/L \pm 13,17 U/L de CK liberada no plasma dos camundongos, valor aproximado ao do grupo controle (NaCl 0,9%) que apresentou 355,7 U/L \pm 28,01 U/L, demonstrando que o γ BjPLI não provoca nenhum dano ao músculo.

Figura 19- Atividade inibitória do γ BjPLI sobre a atividade miotóxica provocada pelas PLA₂ Asp-49 e Lys-49. Após a aplicação via intramuscular das amostras a CK presente no sangue dos camundongos (Swiss) foi quantificada e expressa em U/L. Controle: 50 μ L de salina (NaCl 0,85%), Grupo 1: 50 μ L de γ BjPLI (20 μ g), Grupo 2: 50 μ L de PLA₂ Asp-49 (10 μ g), Grupo 3: 50 μ L de PLA₂ Lys-49 (10 μ g), Grupo 4: 50 μ L de PLA₂ Asp-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g) e Grupo 5: 50 μ L de Lys-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g). Proporção molar de PLA₂:PLI de 1:1,2. * representa diferenças estatísticas quando comparado às PLA₂. ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori*, $p < 0,0001$.



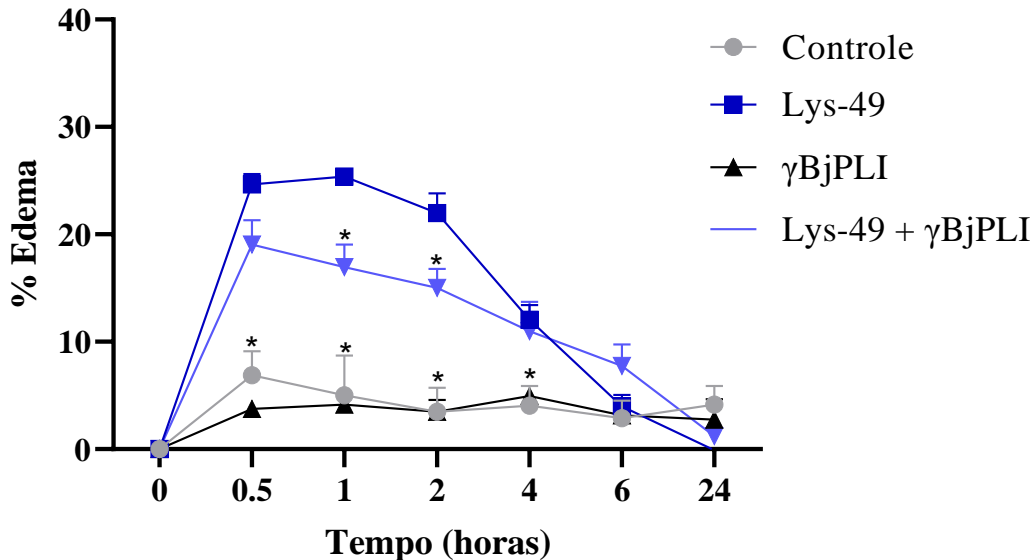
4.9. Inibição da atividade edematogênica

A inibição da atividade edematogênica causada pelas PLA₂ Lys-49 e Asp-49 usando o γ BjPLI como inibidor foi avaliada acompanhando a porcentagem do aumento da espessura da pata dos camundongos ao decorrer de 24 h, após a injeção das amostras de cada grupo.

A injeção de PLA₂ Lys-49 (10 μ g) provocou o aumento de 24% da espessura da pata na primeira meia hora, e atingiu seu pico (25%) após 1 h de experimento. Em seguida, a espessura da pata decaiu, atingindo a porcentagem de edema igual à do grupo controle (3,8%) após 6 h. Quando foi injetada a PLA₂ Lys-49 (10 μ g) previamente incubada com 20 μ g de γ BjPLI, apesar da maior porcentagem de aumento de espessura da pata ter sido atingida na primeira meia hora, o valor foi menor quando comparado com o perfil da PLA₂ Lys-49 isolada e logo em seguida decaiu. Durante a primeira e segunda horas, ocorreu uma inibição de 36% e 28%, respectivamente, estatisticamente significativa (ANOVA de duas vias com Tukey como teste *a posteriori*, $p < 0,05$).

Figura 20 - Neutralização da atividade edematogênica causada pela PLA₂ Lys-49 utilizando o γ BjPLI. Controle: 20 μ L de salina (NaCl 0,85%), Grupo 1: 20 μ L de γ BjPLI (20 μ g), Grupo 2: 20 μ L de PLA₂ Lys-49 (10 μ g), Grupo 3: 20 μ L de PLA₂ Lys-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g). Proporção molar de PLA₂:PLI de 1:1,2. As

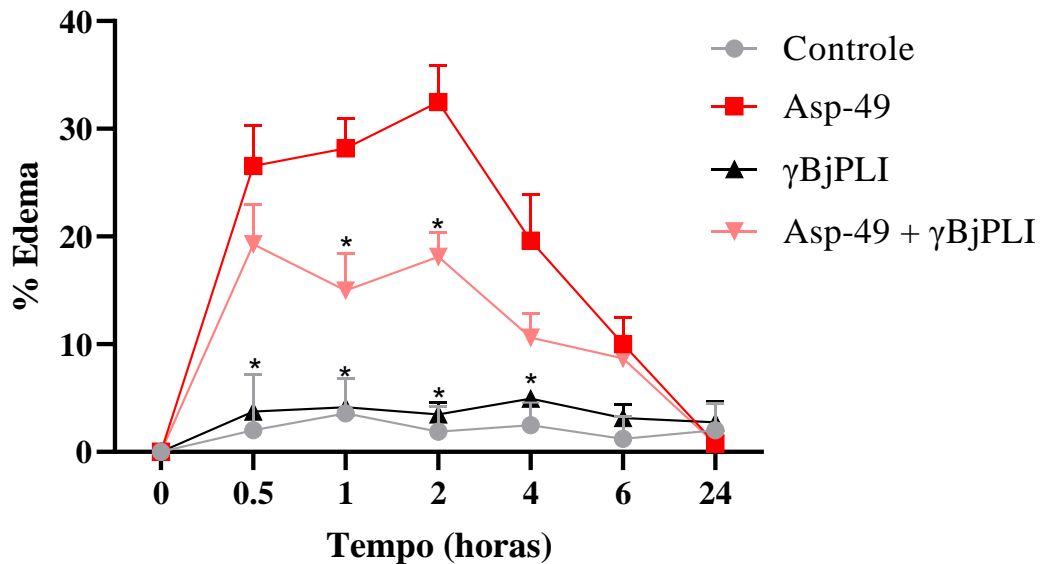
amostras de cada um dos grupos foram injetadas na região subplantar da pata direita dos camundongos (Swiss). O desenvolvimento do edema foi acompanhado por 24 h. * representa valores significativamente diferentes em relação à PLA₂ (ANOVA de duas vias com Tukey como teste *a posteriori*, $p < 0,05$).



Por outro lado, a PLA₂ Asp-49 provocou um aumento de 26% na primeira meia hora e o seu pico foi atingido após 2 h, com um aumento de 32% da espessura da pata. Em seguida, a espessura foi diminuindo até atingir a espessura da pata contralateral (0%) após 24 h. A pré-incubação de 20 μg de γBjPLI com a PLA₂ Asp-49 fez com que o maior aumento de espessura ocorresse na primeira meia hora, atingindo 19%. Após 2 h, ainda apresentou 18% de edema e em seguida decaiu até atingir 0% após 24h. Segundo a análise estatística, o mesmo comportamento descrito na incubação com a PLA₂ Lys-49 ocorreu, ou seja, a primeira e segunda hora apresentaram inibição estatisticamente significativa, atingindo 50% e 43%, respectivamente (ANOVA de duas vias com Tukey como teste *a posteriori*, $p < 0,05$).

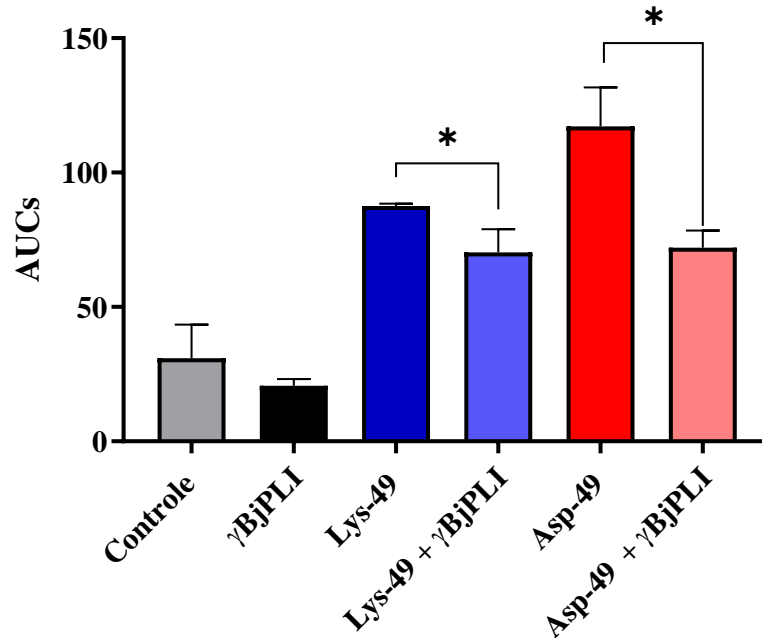
No grupo de camundongos controle (NaCl 0,9%) e no que recebeu apenas 20 μg de γBjPLI foi observado uma baixa porcentagem de edema ao longo de todas as 24 h de experimento. No entanto, as PLA₂ Lys-49 (**Figura 19**) e Asp-49 (**Figura 20**) apresentaram um alto efeito edematogênico.

Figura 21 - Neutralização da atividade edematogênica causada pela PLA₂ Asp-49 utilizando o γ BjPLI. Controle: 20 μ L de salina (NaCl 0,85%), Grupo 1: 20 μ L de γ BjPLI (20 μ g), Grupo 2: 20 μ L de PLA₂ Asp-49 (10 μ g), Grupo 3: 20 μ L de PLA₂ Lys-49 (10 μ g) + γ BjPLI (20 μ g). Proporção molar de PLA₂:PLI de 1:1,2. As amostras de cada um dos grupos foram injetadas na região subplantar da pata direita dos camundongos (Swiss). O desenvolvimento do edema foi acompanhado por 24h. * representa valores significativamente diferentes em relação à PLA₂ (ANOVA de duas vias com Tukey como teste *a posteriori*, $p < 0,05$).



Para melhor comparação da inibição da atividade edematogênica provocada pela PLA₂ Asp-49 e Lys-49, foi calculada a área sob a curva (AUC) de cada grupo descrito anteriormente (**Figura 22**). O inibidor γ BjPLI foi mais eficiente ao inibir a atividade edematogênica da PLA₂ Asp-49 do que a PLA₂ Lys-49, apresentando inibição de 38,5% e 19,6%, respectivamente (ANOVA de uma via com Tukey *a posteriori*, $p < 0,05$).

Figura 22 - Áreas sob a curva da neutralização da atividade edematogênica. Os edemas de pata foram provocados pelas PLA₂ Lys-49 e Asp-49 e o edema foi inibido quando essas moléculas foram incubadas por 30 min com o inibidor γ BjPLI (proporção molar de PLA₂:PLI de 1:1,2). Anova de uma via com Tukey como teste a posteriori (* representa valores de $p < 0,05$).



4.10. Clonagem e expressão

A partir da biblioteca construída por Gomes et al, (2017), foi realizada a amplificação do fragmento de DNA correspondente ao γ BjPLI, por PCR, utilizando-se os *primers* (oligonucleotídeos iniciadores) *forward* e *reverse* descritos na Tabela 4, que, por sua vez, foram construídos de acordo com a sequência de aminoácidos e de nucleotídeos correspondente ao γ BjPLI que já haviam sido descritas (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008; GOMES et al., 2017; SERINO-SILVA et al., 2018).

Tabela 4 – Sequências dos oligonucleotídeos iniciadores.

Nome	Iniciador	Enzima	Sequência (5'-3')
BJPLI_NDE_fw	<i>forward</i>	NdeI	GGGAATTCATATGCGCTCATGTGACTTTTGTCCACAAC
BJPLI_BamHI_rv	<i>reverse</i>	BamHI	GCGGGATCCTCAGAGACTTGTCAATTTGAAGGCG

Como já descrito, o γ BjPLI é uma proteína de 181 aminoácidos com massa molecular de 20.032 Da, e é codificado por uma sequência de 543 bases nitrogenadas (**Figura 23**), que

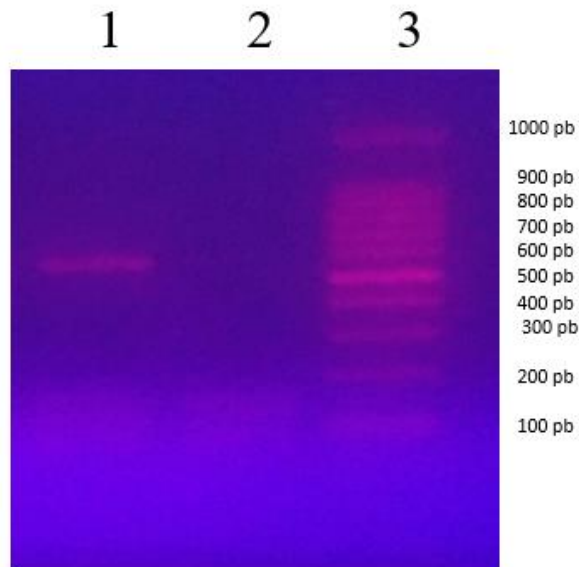
apresenta a sequência TGA como códon de parada. Devido a sequência de nucleotídeos correspondente ao γ BjPLI ter 12 sítios de clivagem internos (AlwNII, BbvII, Bsc91I, BstEII, MfeI, NcoI, PstI, SspI e XmnI) entre as 117 enzimas analisadas, além da compatibilidade com o vetor pET28a, foram inseridos nos *primers forward e reverse* os sítios de restrição para a clivagem com Nde I e Bam HI, respectivamente.

O resultado da amplificação pode ser observado na **Figura 24**, em que foi gerado um fragmento com cerca de 543 pb, valor de acordo com o esperado e sem bandas inespecíficas. Após a confirmação de que a amplificação estava correta, foram feitas 3 novas amplificações por PCR. Um novo gel de agarose 1% foi feito e o fragmento de 543 pb foi excisado, e o DNA foi purificado, na concentração de 50 ng/ μ L.

Figura 23 - Sequência de nucleotídeos e aminoácidos referentes ao γ BjPLI.

	10	20	30	40	50	60
1	CGCTCATGTGACTTTTGT	CACAACATAGGAAAAGATTGCGATGGTTACCAACAGGAATGT				
1	R S C D F C H N I G K D C D G Y Q Q E C					
	70	80	90	100	110	120
61	TCCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAAGGTCTTCCTGGAGATTTTCATCAGCATCGCTGTCA					
21	S S P E D V C G K V F L E I S S A S L S					
	130	140	150	160	170	180
121	GTCCGAAGTGTGCATAAGAAGTGTTCCTCATCCAGCATCTGCAAAGTGGGGCAAATGAT					
41	V R T V H K N C F S S S I C K L G Q I D					
	190	200	210	220	230	240
181	GTAATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACCG					
61	V N I G H H S Y I R G R I N C C E K E P					
	250	260	270	280	290	300
241	TGTGAAGACCAACCGTTTCCGGGACTGCCCTCTCCCGACCAAATGGATACTATTGCCCT					
81	C E D Q P F P G L P L S R P N G Y Y C P					
	310	320	330	340	350	360
301	GGGCAATTGGGACTTTTTACGGAGGACAGCACTGAATATGAAGCTATTGGCCATGGAAGT					
101	G A L G L F T E D S T E Y E A I C H G T					
	370	380	390	400	410	420
361	GAGACTAAGTGCATTGACATCGTGGGACATAGACATGAACATTTTCCTGGAGACATCGCT					
121	E T K C I D I V G H R H E H F P G D I A					
	430	440	450	460	470	480
421	TACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCCTGCTCCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCCAT					
141	Y N L K G C V S S C P L L S L S N A T H					
	490	500	510	520	530	540
481	GAAGAAAACAGAAATTATCTGCAGAAAAGTTGAATGTAAGGACGCCTTCAAATTGACAAGT					
161	E E N R N Y L Q K V E C K D A F K L T S					
	541					
181	CTCTGA					
	L *					

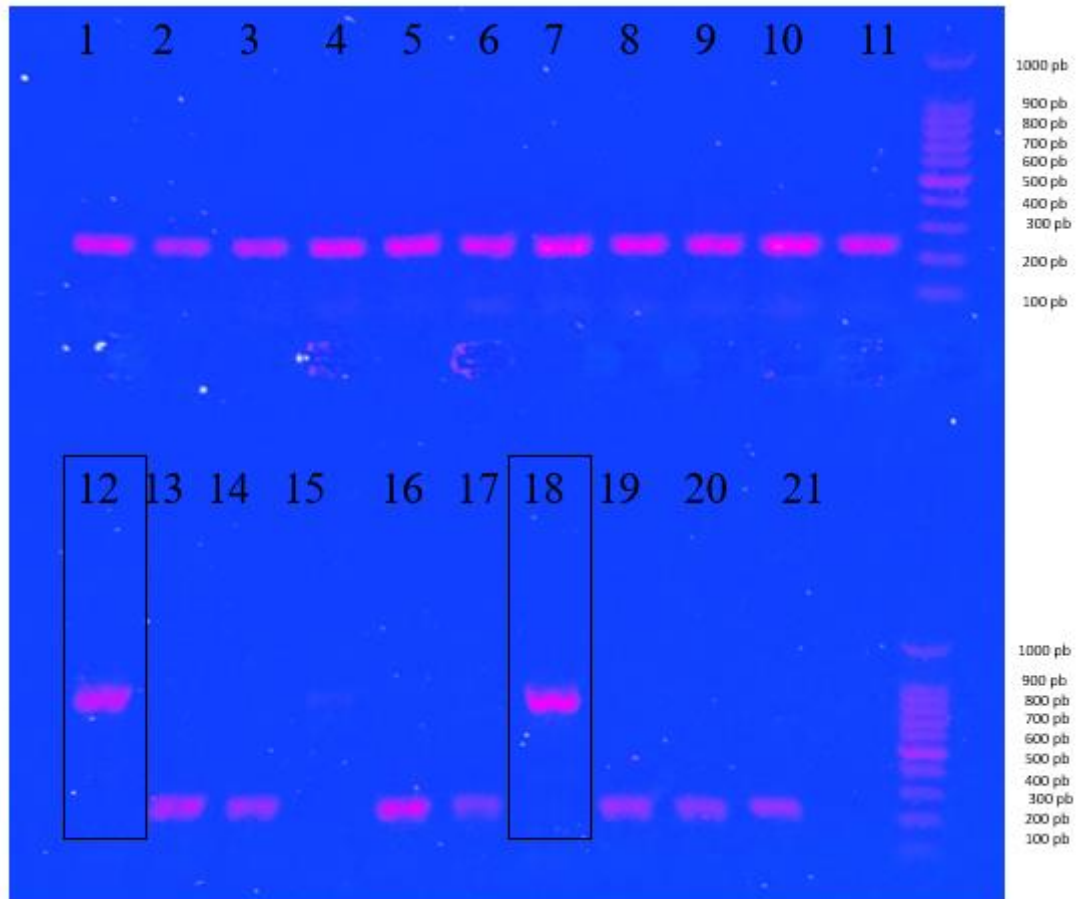
Figura 24 – Amplificação do fragmento correspondente ao γ BjPLI. Análise por gel de agarose 1% do DNA amplificado por PCR. 1 - corresponde ao DNA amplificado utilizando os *primers forward* BJPLI_NDE_fw e *reverse* BJPLI_BamH1_rv a partir da biblioteca de cDNA do fígado da serpente *B. jararaca*. 2 - corresponde a amostra controle (sem DNA). 3 - corresponde ao padrão de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Cellco).



Antes do fragmento ser inserido no vetor final, foi feita uma ligação do fragmento obtido ao vetor pGEM-T *easy* (Promega), o qual facilitou a obtenção de maiores quantidades do fragmento. O sistema pGEM-T *easy* é um kit que contém um plasmídeo linear de 3015 pb, que possui uma desoxitimidina (T) em cada uma de suas extremidades 3' e que permite a inserção direta de produtos de PCR. Para isso, o fragmento de 543 pb do γ BjPLI foi inserido através de uma ligação, numa proporção 1:27, no vetor pGEM-T *easy*. Em seguida, o vetor pGEM-T *easy*+ γ BjPLI foi transformado por eletroporação em cepas de *E. coli* DH5a, que foram crescidas e selecionadas em placas de Petri contendo meio LB e o antibiótico ampicilina.

Para verificar se o pGEM-T *easy*+ γ BjPLI havia sido inserido corretamente nas colônias, selecionou-se 20 delas e utilizou-se os *primers* promotor M13 e *terminator* M13, o que nos possibilitou observar que das colônias selecionadas apenas 2 possuíam o pGEM-T *easy*+ γ BjPLI. Esse número foi abaixo do esperado. As colônias positivas foram denominadas colônia 12 e 18, e apresentaram bandas no gel de agarose 1% com aproximadamente 800 pb, ao contrário das colônias negativas que apresentaram bandas de aproximadamente 240 pb (**Figura 25**).

Figura 25 – Clonagem do pGEM-T *easy*+ γ BjPLI em DH5 α . Análise por gel de agarose 1% do DNA amplificado por PCR. A última coluna de cada linha corresponde ao padrão de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Cellco). De 1 a 21 estão as amostras de colônias amplificadas por PCR.



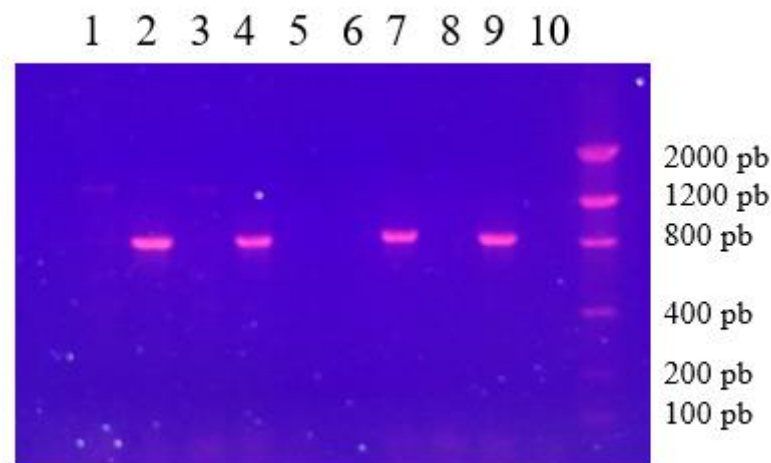
Após sequenciamento das bases nucleotídicas dos fragmentos gerados pela utilização dos *primers* promotor M13 e *terminator* M13 das colônias 12 e 18, observou-se que a colônia 18 possuía a mesma sequência que codificava para a proteína γ BjPLI (**Figura 23**). Já a colônia 12 apresentou uma sequência semelhante a esperada, porém possuía uma alteração no aminoácido 57, em que trocava uma glicina (G) por um glutamato (E). Dessa maneira optou-se por continuar os experimentos seguintes utilizando a colônia 18.

Assim, a colônia 18 foi crescida em 100 mL de meio LB contendo ampicilina, e o vetor foi purificado da cepa de *E. coli* DH5 α , rendendo uma solução de 100 μ L a 2570 ng/ μ L. A seguir, o fragmento do γ BjPLI foi isolado do vetor pGEM-T *easy*+ γ BjPLI através das enzimas de restrição Bam HI e Nde I. Para garantir que o vetor final adquirisse as extremidades coesivas complementares, o pET28a também foi submetido a incubações com as enzimas de restrição Bam HI e Nde I. Em seguida ambos foram ligados numa proporção 1:17 e o vetor

pET28a+ γ BjPLI foi transformado por eletroporação em cepas de *E. coli* DH5 α , que foram crescidas e selecionadas em placas de Petri contendo meio LB e o antibiótico canamicina.

Para verificar se o pET28a+ γ BjPLI havia sido inserido corretamente nas colônias, 10 delas foram selecionadas e utilizou-se os *primers* T7P e T7F. As colônias positivas apresentaram bandas no gel de agarose 1% no valor de aproximadamente 800 pb (**Figura 26**). Deste modo, das 10 colônias selecionadas apenas 4 delas possuíam o pET28a+ γ BjPLI.

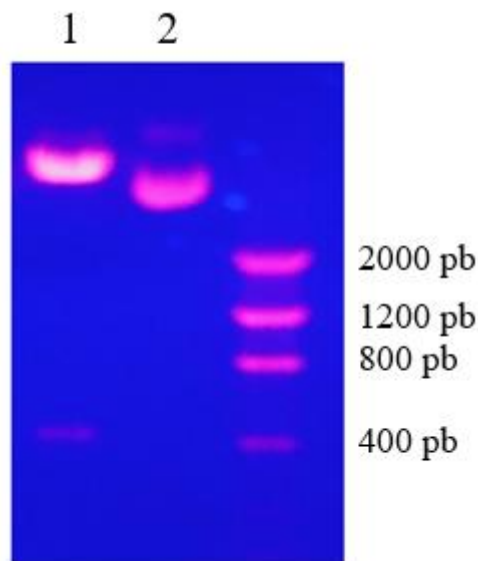
Figura 26 - Clonagem do pET28a+ γ BjPLI em DH5 α . Análise por gel de agarose 1% do DNA amplificado por PCR. A última coluna corresponde ao padrão de massa molecular (Low mass 100 pb a 2000 pb). De 1 a 10 estão as amostras de colônia amplificadas por PCR.



A colônia 2, que estava positiva na amplificação feita por PCR, foi escolhida para os seguintes experimentos. Inicialmente, essa colônia foi crescida em 100 mL de meio LB contendo canamicina, e o vetor pET28a+ γ BjPLI foi purificado da cepa de *E. coli* DH5 α , rendendo uma solução de 70 μ L a 621 ng/ μ L.

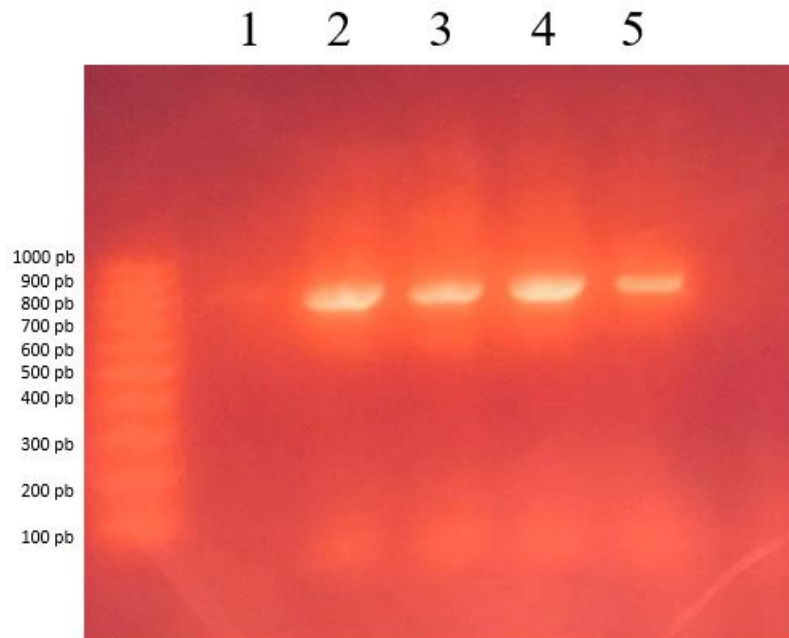
Para confirmar que o vetor purificado se tratava do pET28a+ γ BjPLI, foi feita uma análise de restrição, na qual a amostra do vetor foi incubada com a enzima NCo I. Esta enzima possui capacidade de clivar na posição 351 (C/CATGG) do γ BjPLI e na 296 do pET28a, gerando um fragmento de 411 pb, que é possível observá-lo na coluna 1 (amostra incubada com a enzima) da **Figura 27**, ao contrário da coluna 2 (amostra não incubada com a enzima) que apresenta apenas o vetor fechado, que possui 5369 pb.

Figura 27 – Análise de restrição. 1 - controle positivo (digerida com NCO I), 2 - controle negativo (Sem adição da enzima NCO I). A última coluna corresponde ao padrão de massa molecular (Low mass 100 pb a 2000 pb).



Além disso, a sequência dos nucleotídeos da colônia 2 foi sequenciada e confirmada como sendo a mesma descrita na **Figura 23**. O vetor purificado pET28a+ γ BjPLI foi então inserido na cepa de expressão *SHuffle* de *E. coli*, através de uma transformação por choque térmico. Após as colônias serem crescidas e selecionadas em placas de Petri contendo meio LB e o antibiótico canamicina, cinco colônias foram então analisadas por PCR, no qual fragmentos foram amplificados utilizando-se os *primers* T7P e T7T. Através do gel de agarose 1%, notou-se que das 5 colônias analisadas, 4 delas foram positivas para a inserção do vetor pET28a+ γ BjPLI na cepa de expressão *SHuffle*, sendo elas as colônias 2, 3, 4 e 5 (**Figura 28**).

Figura 28 - Clonagem do pET28a+ γ BjPLI em *SHuffle*. Análise por gel de agarose 1% do DNA amplificado por PCR. A primeira coluna corresponde ao padrão de massa molecular 100 pb DNA Ladder (Cellco). De 1 a 5 estão as amostras de colônia amplificadas por PCR.



As 4 colônias positivas foram então submetidas ao teste de expressão, sendo crescidas em meio LB líquido contendo o antibiótico canamicina. Em seguida, ao atingirem a absorbância de 0,6, foram induzidas com IPTG para duas concentrações finais diferentes (0,1 mM e 0,4 mM) e comparadas com uma amostra que não foi adicionada o IPTG, como controle negativo. Sabendo-se que o γ BjPLI recombinante possui 206 aminoácidos devido a adição da cauda de histidina, e uma massa de 22.682 Da e ponto isoelétrico de 6,22 (**Figura 29**), as amostras induzidas e não induzidas foram analisadas por SDS-PAGE 15% sob condições reduzidas.

Figura 29 – Sequência de aminoácidos correspondentes ao γ BjPLI recombinante. A cauda de histidina esta destacada em cinza.

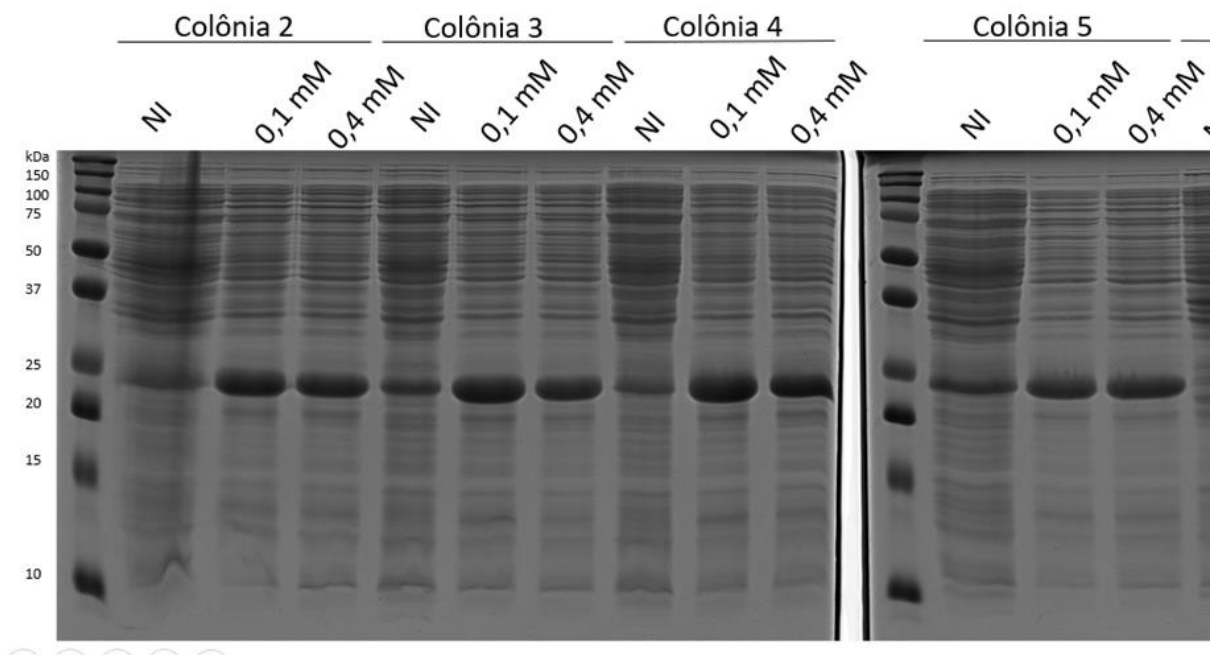
```

      10      20      30      40      50      60
MGSSHHHHHH SSSLVPRGSH MGGNSRSCDF CHNIGKDCDG YQQECSSPED VCGKVFLEIS
      70      80      90     100     110     120
SASLSVRTVH KNCFSSSICK LGQIDVNIGH HSYIRGRINC CEKEPCEDQP FPGLPLSRPN
      130     140     150     160     170     180
GYYCPGALGL FTEDSTEYEA ICHGTETKCI DIVGHRHEHF PGDIAYNLKG CVSSCPLLSL
      190     200
SNATHEENRN YLQKVECKDA FKLTSL

```

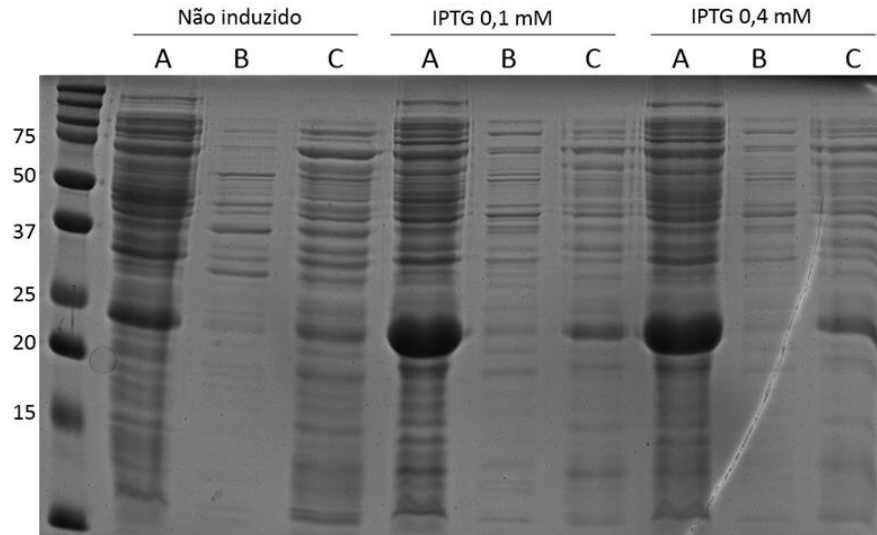
Segundo a análise de SDS-PAGE 15%, todas as colônias analisadas, em ambas as concentrações de IPTG, foram capazes de induzir a cepa *SHuffle* de *E. coli* a produzir uma banda entre 20 e 25 kDa, correspondentes ao γ BjPLI recombinante, sem significativa diferença (Figura 30).

Figura 30 – Expressão do γ BjPLI recombinante a partir dos clones positivos amplificados por PCR. A análise foi realizada em SDS-PAGE 15%. Cada colônia foi analisada em três condições distintas, sendo elas sem a adição de IPTG (NI; não induzido) ou induzidas com 0,1 mM e 0,4 mM de IPTG. Marcador molecular Dual Color (Bio-Rad).



Além da análise de expressão, a colônia 3 da cepa *SHuffle* contendo o vetor pET28a+ γ BjPLI foi submetida a um teste de solubilidade, na qual foi suspensa em três condições. De acordo com o SDS-PAGE 15%, nota-se que a maior parte do γ BjPLI, provavelmente, está sendo expressa na forma de corpos de inclusão, pois a banda entre 20 e 25 kDa continua maior na condição A, que corresponde ao *pellet* e onde estão as proteínas da lise celular que não foram solubilizadas pelas outras duas condições, sendo a primeira em Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM pH 8,0 (B) e a segunda em Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM Ureia 6 M pH 8,0 (C) (Figura 31).

Figura 31 - Solubilidade do γ BjPLI recombinante a partir dos clones positivos amplificados por PCR. A análise foi realizada em SDS-PAGE 15%. Uma das colônias foi analisada em nove condições distintas, sendo elas sem a adição de IPTG (NI; não induzido) ou induzidas com 0,1 mM e 0,4 mM de IPTG. Além disso (A) representa as proteínas insolúveis, (B) representa as proteínas solúveis em Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM pH 8,0 e (C) representa as proteínas solúveis em Tris-HCl 100 mM, NaCl 300 mM pH 8,0 + Ureia 6 M. Marcador molecular Dual Color (Bio-Rad).



5. Discussão

Neste trabalho foi possível observar, através das técnicas de SDS-PAGE, *Western blotting* e cromatografia de afinidade, a presença de proteínas no plasma de jovens e adultos que interagem com proteínas do próprio veneno da serpente *B. jararaca*, corroborando estudos anteriores (DE MORAIS-ZANI et al., 2013; GOMES et al., 2017). Ademais, foi demonstrada a presença dessas proteínas pela primeira vez em neonatos com 2 dias de vida. Também foi observada a presença do γ BjPLI em todas as amostras analisadas por *Western blotting* e ELISA. Através da análise de espectrometria de massas, foi identificada a presença de proteínas inibidoras de PLA₂ das classes α PLI, β PLI e γ PLI, bem como fatores anti-hemorrágicos, que são descritos como inibidores de metaloproteases.

Utilizando técnicas de antivenômica descritas por Calvete e colaboradores (2011), e baseadas em colunas de afinidade, Gibbs e colaboradores (2020) isolaram e identificaram 45 tipos de proteínas plasmáticas, com provável função de resistência presentes em esquilos terrestres da Califórnia (*Otospermophilus beecheyi*), que são predados pela serpente peçonhenta *Crotalus oreganus oreganus*, sendo as disintegrinas, metaloproteases e PLA₂ do veneno os principais alvos das proteínas isoladas.

Gomes e colaboradores (2017), analisando o transcriptoma do fígado da serpente *B. jararaca*, identificaram transcritos de γ PLI, Bj46a-like, *inter-alpha-trypsin inhibitor* e inibidor C1 de proteases. Além disso, Morais-Zani e colaboradores (2013) descreveram a presença de proteínas do sistema complemento, além de Bj46a e γ PLI no plasma da *B. jararaca*.

Essas proteínas já descritas no plasma da *B. jararaca* possuem massas variadas, como os inibidores Bj46a e Bj46b de 46 kDa, o inibidor BjI com massa molecular nativa superior a 1000 kDa, o fibrinogênio de 372 kDa e o γ BjPLI com monômeros em torno de 22 kDa (DE MORAIS-ZANI et al., 2013; GOMES et al., 2017; VIEIRA et al., 2008; SERINO-SILVA et al., 2018).

Nesse estudo, foi possível observar um aumento de intensidade e número de bandas do plasma reconhecidas pelo veneno, por *Western blotting* (**Figuras 4 e 5**), apenas em 25 kDa. Portanto, analisando apenas as membranas de *Western blotting*, sugere-se que apenas o γ BjPLI ou outras isoformas de γ PLI foram reconhecidas. No entanto, pela análise de espectrometria de massas (**Tabela 2**), também foram identificadas outras proteínas, incluindo os fatores anti-hemorrágicos, que são descritos como inibidores de metaloproteases.

Para esclarecer quais bandas correspondiam ao γ BjPLI, foi feito o reconhecimento de bandas por *Western blotting* e dosagem de γ BjPLI por ELISA, utilizando anticorpos anti- γ BjPLI, produzidos em camundongos da linhagem BALB/c. De acordo com os resultados obtidos pelo *Western blotting*, o padrão de bandas reconhecidas pelo anti- γ BjPLI e pelo veneno de *B. jararaca* não foram os mesmos, sendo que, no primeiro caso (**Figura 7**), foi reconhecida apenas uma única banda de 25 kDa, sem diferenças de intensidades nos grupos estudados (neonatos, jovens e adultos, fêmeas e machos), enquanto, no segundo caso, a intensidade e números de bandas aumentou conforme a idade (**Figura 4**).

Além disso, quando essas mesmas amostras foram avaliadas por ELISA (**Figura 8**), diferenças significativas foram encontradas na abundância de γ BjPLI quando comparados os diferentes grupos, provavelmente devido a uma maior sensibilidade deste método em relação ao *Western blotting* (**Figura 7**). Uma das hipóteses para estas diferenças é de que as proteínas podem estar expostas de forma diferente, de acordo com as condições de cada método, facilitando ou não as ligações (TASIMA et al., 2020a).

É interessante notar que as bandas do plasma que foram reconhecidas pelas proteínas do veneno de *B. jararaca* apresentaram aumento de intensidade, conforme os animais se tornam mais velhos, no teste de *Western blotting* (**Figura 4**). Resultados similares foram observados no ensaio de ELISA (**Figura 8**), sugerindo assim uma variabilidade ontogenética na composição de inibidores desses animais. Por outro lado, nenhuma diferença foi encontrada quando comparado fêmeas e machos sem distinção por idade.

Além disso, mesmo não sendo possível detectar os inibidores da classe α (18 kDa) e β (37 kDa) nos experimentos de reconhecimento por *Western blotting* (**Figura 4**), os resultados dos experimentos de análise de espectrometria de massas (**Tabela 2**) mostraram que no plasma da serpente *B. jararaca* estão presentes as três classes de PLI (α PLI, β PLI e γ PLI). No caso do β PLI isso pode ter ocorrido devido à baixa abundância dessas proteínas no plasma em relação aos inibidores da classe γ , como demonstra a **Figura 11**, enquanto o baixo reconhecimento de α PLI pode estar relacionado com outras características de reconhecimento que foram incompatíveis com a metodologia usada.

Por espectrometria de massas, também não foi possível detectar diferença estatisticamente significativa entre as amostras em relação à ontogenia e sexo, porém os

resultados demonstram uma diminuição da abundância de γ PLI, um aumento na abundância de α PLI e uma estabilidade na abundância de β PLI.

Por análise de transcriptoma do fígado foi identificado um aumento de 30 vezes da abundância de γ PLIs em adultos em relação aos jovens (GOMES et al., 2017), enquanto por proteômica foi descrito o inverso, sendo identificado uma maior quantidade em jovens do que em adultos, representadas por 70% e 30%, respectivamente, em relação ao total de proteínas identificadas (DE MORAIS-ZANI et al., 2013; GOMES et al., 2017).

A diferença metodológica pode ser, mais uma vez, uma das principais responsáveis pela variação do número de proteínas identificadas, pois, ainda há uma grande complexidade de proteínas no plasma, cujas proteínas com grande abundância relativa podem mascarar outras proteínas minoritárias (GIANAZZA et al., 2016).

Spots entre 20 kDa e 25 kDa identificados como PLIs por estudo proteômico (DE MORAIS-ZANI et al., 2013) podem ser relacionados às bandas reconhecidas pelo veneno de *B. jararaca* por *Western blotting* (**Figuras 4 e 5**) apresentadas neste trabalho, reforçando a hipótese de que todas sejam diferentes isoformas de PLIs, que aumentam a concentração durante o desenvolvimento ontogenético. Por outro lado, não foi possível correlacionar a banda que aparece um pouco acima de 25 kDa com nenhuma proteína de plasma já descrita na literatura, necessitando estudos futuros.

A diferença encontrada na expressão de proteínas entre jovens e adultos do trabalho de transcriptoma pode também estar relacionada com fatores pós-genômicos, pois a expressão de proteínas muitas vezes precisa ser ativada para que não sejam constantemente expressas, garantindo a plasticidade dos organismos (GOMES et al., 2017). Sabe-se que existem sistemas de regulação de expressão das proteínas de venenos em vários níveis, principalmente durante a transcrição e tradução. Micro RNAs (miRNA) já foram descritos como um dos responsáveis pela mudança ontogenética da composição do veneno de serpentes da espécie *Crotalus simus simus*, e portanto essa regulação da expressão proteica também pode ter um papel importante na expressão das proteínas do plasma com função inibitória (CASEWELL et al., 2014; DURBAN et al., 2013). Além disso, em relação aos venenos, já foi descrito que a remoção do veneno ou o aumento de noradrenalina podem ativar fatores transcricionais que desencadeiam o ciclo de produção de proteínas da glândula de veneno da *B. jararaca*, sendo também demonstrada diferença sexual nessa ativação (LUNA et al., 2009).

A variação ontogenética da composição do veneno da *B. jararaca* já foi descrita, primeiro por Furtado e colaboradores (1991), que analisaram o veneno de neonatos e suas mães de 9 espécies de *Bothrops*, incluindo a *B. jararaca*, depois por Andrade e Abe (1999), correlacionando a toxicidade de jovens e adultos com a própria alimentação. Finalmente, Zelanis e colaboradores descreveu a composição do veneno após análise transcriptômica, proteômica e peptidômica. Nesse estudo, as PLA₂ foram descritas como parte das famílias proteicas que variam em porcentagem, sendo que em neonatos compreendem 12,9% enquanto em adultos correspondem 9,5%. Ademais, há uma grande diferença também entre sexo, sendo que o veneno de machos adultos possuem 17,6% de PLA₂ enquanto as fêmeas adultas possuem apenas 3,6% (ZELANIS et al., 2012a, 2012b). As diferenças de abundância relativa das PLA₂ seguem um padrão semelhante ao encontrado na abundância relativa de γ PLI na **Figura 11**, no qual os neonatos aparentam ter mais γ PLI do que os adultos, e o macho adulto possui maior abundância que a fêmea adulta, mas diferenças estatísticas não foram encontradas. Kinkawa e colaboradores (2010) já haviam descrito que a expressão de α PLI e β PLI no fígado de *Gloydius brevicaudus* podem ser induzidas pela inoculação de PLA₂ ativas e inativas, porém ainda não havia sido observado o aumento na expressão de γ PLI.

Em relação às mudanças ontogenéticas de veneno de serpentes do gênero *Bothrops*, a composição do veneno de indivíduos da espécie *B. moojeni* foi acompanhada e mostrou que os machos neonatos possuem cerca de 20% de PLA₂ e atingem 36% após um ano de idade e em seguida aos dois anos já atingem 39% o que se mantém na fase adulta. Por outro lado as fêmeas apresentam 23% enquanto neonatas e só mudam a composição aos três anos, quando atingem 44% de PLA₂, mantendo-se durante a fase adulta (HATAKEYAMA et al., 2021). Levando isso em consideração e comparando esses resultados com os obtidos pela quantificação de γ BjPLI por ELISA (**Figura 8**), pode ser observado um padrão similar, no qual os machos adultos atingem maiores concentrações de PLA₂ e γ BjPLI mais cedo que as fêmeas. Entretanto, para confirmar se o aumento da expressão de PLA₂ no veneno desencadeia a expressão de γ BjPLI ou outras isoformas de PLIs, novos estudos são necessários.

A presença dessas proteínas no plasma de neonatos provavelmente ocorre pela necessidade de proteção contra o autoenvenenamento, bem como contra a picada das serpentes da mesma ninhada, uma vez que são serpentes vivíparas, e em cada ninhada nascem de 5 a 16 neonatos já desenvolvidos (HARTMANN; HARTMANN; GIASSON, 2003; IVAN SAZIMA, 1992). Embora fêmeas e machos nasçam com o mesmo tamanho, as fêmeas tardam mais para entrar na maturidade reprodutiva, porém atingem tamanhos mais robustos quando adultas

(IVAN SAZIMA, 1992; S.R.T. CARDOSO, 2001). Segundo Passos (2018), os machos ficam sexualmente maduros geralmente a partir dos 13 meses de idade, independentemente do tipo de alimentação, enquanto as fêmeas ficam maduras sexualmente entre 17 e 22 meses, de acordo com o tipo de alimentação. Outros autores, entretanto, postulam que a maturação sexual de fêmeas ocorre com cerca de 24 meses (ALMEIDA-SANTOS, 2005; PASSOS, 2018). Sendo assim, o aumento de PLIs no plasma de *B. jararaca* apresentado no ELISA (**Figura 8**) também pode estar relacionado com outros fatores que ocorrem com a maturação dos indivíduos, já que o grupo de jovens fêmeas possui no máximo 20 meses de idade e podem não estar totalmente maduras, enquanto os machos já estavam com mais de 16 meses e provavelmente maduros.

Em suma, no presente trabalho, foi demonstrada a presença de diferentes inibidores endógenos e, mais precisamente, diferentes isoformas de PLI em serpentes da espécie *B. jararaca* desde que nascem. A presença de α PLI e β PLI foi, pela primeira vez, identificada no plasma de *B. jararaca* neonatas, jovens e adultas. Porém, os resultados conflitantes obtidos entre as diferentes metodologias utilizadas neste estudo, não nos permitem afirmar que haja uma diferença ontogenética na composição de γ BjPLI ou de inibidores de outras classes.

Os dados apresentados mostram que o γ BjPLI está presente no plasma de serpentes neonatos, jovens e adultas da espécie *B. jararaca*. Além disso, estudo anterior realizado pelo nosso grupo mostrou que o γ BjPLI inibe as atividades enzimática, miotóxica e edematogênica da PLA₂ Asp-49 de *C. d. terrificus* (Serino-Silva et al, 2018). Sendo assim, neste trabalho foi avaliada a ação do γ BjPLI frente à atividade anticoagulante da crotoxina, e comparada a ação inibitória do γ BjPLI frente às ações provocadas por PLA₂ Asp-49 de *C. d. terrificus* com as da Lys-49 isolada da *B. jararacussu*.

Já foram isoladas e sequenciadas duas PLA₂ do veneno de *B. jararaca*. Ambas apresentaram 100% de identidade e são descritas como PLA₂ ácidas, com pI de 4,4, massa molecular de 14 kDa e enzimaticamente ativas, contendo o aminoácido Asp na posição 49 (CEDRO et al., 2018; SERRANO et al., 1999). Ambas PLA₂ são capazes de inibir a agregação plaquetária e induzir inflamação local aguda (CEDRO et al., 2018; SERRANO et al., 1999). No entanto, embora a porcentagem de PLA₂ descrita nos estudos proteômicos dos venenos de *B. jararaca* variem de 3 a 20%, os métodos de purificação descritos apresentam isolamento de apenas 0,20-0,35 % de PLA₂ em relação ao conteúdo proteico total do veneno (CEDRO et al., 2018; GONÇALVES-MACHADO et al., 2016; SERRANO et al., 1999; ZELANIS et al., 2012b). Dessa forma, uma das alternativas para o estudo destes inibidores tem sido a utilização

de PLA₂ de mais fácil obtenção, ou seja, isolado do veneno de serpentes que apresentem maior abundância de PLA₂.

A PLA₂ Asp-49 de *C. d. terrificus*, utilizada neste estudo, é uma das PLA₂ mais caracterizadas, descrita como uma proteína heterodimérica de 23 kDa, que faz parte da proteína crotoxina (Ctx). Ctx é formada por uma PLA₂ básica de ~14 kDa, com atividade enzimática, complexada a outra molécula ácida de 9,5 kDa, sem atividade enzimática, chamada crotopotina (FERNANDES et al., 2017).

A crotoxina, por ser uma das proteínas mais abundantes do veneno de *C. d. terrificus* (40-80%), pode ser facilmente isolada e foi a primeira molécula de veneno de serpente a ter sua estrutura tridimensional descrita por cristalografia (FAURE; XU; SAUL, 2011; GEORGIEVA et al., 2010; TASIMA et al., 2020b, 2020a; VITAL-BRAZIL, 1972). O efeito tóxico do veneno de *C. d. terrificus* tem sido atribuído à crotoxina, bem como sua atividade neurotóxica, miotóxica, nefrotóxica, cardiotoxica, imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, ação analgésica e anticoagulante (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978; KOUYOUUMDJIAN; HARRIS; JOHNSON, 1986; PREZOTO et al., 2018; SAMPAIO et al., 2010; SANTOS et al., 1990).

Neste trabalho, foi analisada a interação do γ BjPLI na inibição da atividade anticoagulante da crotoxina. Para isso, foi utilizada a mesma técnica que Prezoto e colaboradores (2018) utilizaram para descrever a atividade anticoagulante da crotoxina. Nessa técnica é empregada a análise de tromboelastometria rotacional, utilizando amostras de plasma de galinha, deficientes em fator XII, recalcificado e simultaneamente estimulado com um reagente ativador da coagulação (TTPA clot), que resulta na lentidão na formação espontânea de trombina e fibrina, tornando assim mais fácil a obtenção de uma curva dose-resposta quando comparado com a utilização de plasma de outros mamíferos.

A crotoxina prolongou o TC de forma significativa, fenômeno descrito por Prezoto et al., (2018). Alguns autores sugerem que, *in vitro*, essas reações ocorram devido à inibição da formação do complexo protrombinase (composto pelo FX, FV, fosfolipídios e cálcio) via um mecanismo fosfolipídio-independente, resultando na ligação com o fator Xa (FAURE; XU; SAUL, 2011; OLIVEIRA et al., 2009; PREZOTO et al., 2018).

Quando a crotoxina foi previamente incubada com o γ BjPLI, foi demonstrada a inibição de 82% da sua atividade anticoagulante, valor maior do que o apresentado pelo γ PLI isolado da

B. jararacussu (45%) também sob a atividade da crotoxina. Porém, o γ PLI isolado da *B. jararacussu* obteve valores de inibição ainda maiores (84% de inibição) sobre a PLA₂ Asp-49 da própria serpente (*B. jararacussu*), enquanto um α PLI isolado do plasma de *B. jararacussu* não conseguiu inibir de forma significativa este efeito da PLA₂ (OLIVEIRA et al., 2008; 2011). Estes resultados corroboram o trabalho de Lizano e colaboradores (2000), o qual afirma que os γ PLI possuem uma maior eficácia na inibição de PLA₂ com Asp-49 do que os α PLI e que esses inibidores possuem melhor atividade de inibição sobre as PLA₂ da própria espécie.

Atualmente, há duas hipóteses para a existência dessas proteínas com capacidades de inibir a atividade anticoagulante de PLA₂. A primeira é a de proteção contra o autoenvenenamento (OLIVEIRA et al., 2008, 2011; SANTOS-FILHO et al., 2011). A segunda hipótese foi descrita recentemente, no trabalho de Rodrigues e colaboradores (2021), no qual é descrito um γ PLI similar ao γ BjPLI, isolado do soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*. Esse inibidor possui a capacidade de inibir a atividade anticoagulante do veneno da serpente peçonhenta *Micrurus laticollaris*, rico em PLA₂, sugerindo que este γ PLI também pode ter surgido devido a pressões co-evolutivas do tipo presa-predador.

Com isso, o estudo destes inibidores na ação anticoagulante de PLA₂ são de grande relevância, pois as alterações na coagulação sanguínea são comumente referidas à ação de metaloproteases e serinoproteases, porém as PLA₂ também possuem papéis importantes. As PLA₂ são capazes de induzir a agregação plaquetária, devido à sua ação enzimática que cliva os fosfolipídios de membrana da plaqueta, liberando ácido araquidônico, o qual é um conhecido agonista da agregação, além de apresentarem função agonista pela interação das PLA₂ com receptores da superfície da plaqueta inibindo o processo de agregação (GIMENEZ et al., 2021; JOSEPH et al., 2002).

Outro ponto que foi analisado neste trabalho foi a comparação das ações do γ BjPLI sobre PLA₂ Asp-49 e PLA₂ Lys-49. Para isso, foi isolada a PLA₂ de *C. d. terrificus* (Asp-49) e a BthTX-I, que pode ser encontrada na literatura como bothropstoxin-I, é uma PLA₂ básica que possui o aminoácido Lys na posição 49 e é de fácil obtenção devido a sua abundância no veneno da *B. jararacussu* (KASHIMA et al., 2004).

O veneno da *B. jararacussu* tem sido descrito como uma das principais fontes de PLA₂. Dentre as serpentes do gênero *Bothrops*, esta espécie está entre as que possui maior abundância relativa de PLA₂, chegando a 40% do total de proteína (TASOULIS; ISBISTER, 2017).

Segundo o transcriptôma de *B. jararacussu*, as PLA₂ podem ainda ser divididas entre Lys-49 básicas (83%), Asp-49 básicas (8%) e Asp-49 ácidas (9%) (HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988; KASHIMA et al., 2004). As duas isoformas mais bem caracterizadas são a bothropstoxin I (BthTX I) e a bothropstoxin II (BthTX II), sendo a primeira uma Lys-49 e a segunda uma Asp-49 e as suas atividades também têm sido desafiadas utilizando inibidores naturais de PLA₂ (GIMENES et al., 2014; OLIVEIRA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2011; Z. OLIVEIRA et al., 2011). A BthTX I (PLA₂ Lys49) é considerada uma miotoxina de 13,7 kDa e pI de 8,2, enzimaticamente inativa (CINTRA et al., 1993; HOMSI-BRANDEBURGO et al., 1988). Além do seu papel mionecrótico, está envolvida no desencadeamento da inflamação, possui atividade citotóxica contra células normais e tumorais, atividade indutora de edema e dor, e também atividade antimicrobiana (BOENO et al., 2019; RANÉIA E SILVA, 2021; HELOISE et al., 2019; SANTOS-FILHO et al., 2021).

Devido à alta relevância dessas isoformas de PLA₂ frente aos efeitos do envenenamento, tem se estudado o uso de PLIs na neutralização das suas atividades. A atividade inibitória de dois inibidores (α e γ BjussuMIPs) provenientes do plasma da serpente *B. jararacussu* foi avaliada em PLA₂ Asp-49 de *B. jararacussu*, *B. pirajai* e *C. d. terrificus*, e Lys-49 de *B. jararacussu* e *B. pirajai*, sendo que o inibidor do tipo γ foi mais eficiente na inibição das atividades de ambas as PLA₂ Asp-49 enquanto o do tipo α foi mais eficiente ao inibir as atividades das PLA₂ Lys-49 (OLIVEIRA et al., 2008; Z. OLIVEIRA et al., 2011). O inibidor do tipo α isolado do plasma de *B. alternatus* (α BaltMIP) foi eficiente ao inibir as atividades citotóxica e miotóxica da Lys-49 também da *B. jararacussu* (SANTOS-FILHO et al., 2011). Além disso, o inibidor do tipo γ de *C. d. collilineatus* (γ CdcPLI) também foi testado contra as atividades de PLA₂ Asp-49 de *B. jararacussu* e *B. pauloensis* e da PLA₂ Lys-49 da *B. pauloensis*, sendo que apresentou maiores porcentagens de inibições para as PLA₂ Asp-49 do que para as Lys-49, o que reforça a teoria de que inibidores do tipo γ possuem um domínio que se liga na região da PLA₂ responsável por sua ligação ao cálcio (GIMENES et al., 2014).

Comparando o alinhamento da sequência de aminoácidos das duas PLA₂ estudadas neste trabalho, Lys-49 de *B. jararacussu* e Asp-49 de *C. d. terrificus*, além da sequência de aminoácido da PLA₂ descrita no veneno da serpente *B. jararaca* (SERRANO et al., 1999), nota-se uma variação grande na composição de aminoácidos entre as três proteínas, sendo que a proveniente de *C. d. terrificus* é mais similar à de *B. jararaca*, pois compartilham sequências conservadas em duas regiões importantes para a manutenção da atividade enzimática, contendo, inclusive o aminoácido Asp na posição 49 (**Figura 32, em destaque**). Além disso, embora

ainda não tenha sido descrito o isolamento de PLA₂ Lys-49 no veneno de *B. jararaca*, já foi identificado a presença dessa proteína com sequência idêntica à de *B. jararacussu* na análise de seu proteoma (GONÇALVES-MACHADO et al., 2016).

Figura 32 - Alinhamento da sequência de aminoácidos das PLA₂. O alinhamento das PLA₂ de *B. jararacussu* (Bjussu), *B. jararaca* (Bj) e *C. d. terrificus* (Cdt) foi feito utilizando o Clustal Omega. O símbolo (*) indica os resíduos de aminoácidos iguais entre as sequências; (:) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza igual, (.) indica mudança de resíduo de aminoácido com natureza diferente. Em magenta está destacado o aminoácido na posição 49; em amarelo estão destacados os resíduos de cisteínas; O box representa regiões importantes para a atividade catalítica.

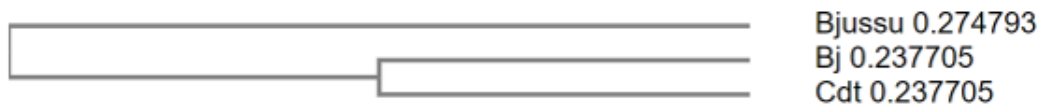
```

Lys-49 Bjussu      SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGNCVGLGRGKPKDATDRCCYVHICCCYKKLITGCNPK 60
Asp-49 Bj         DLWQFGQMMNDVMREYVVFNYLYYGCYCGWGGIGKPRDATDRCCFVHICCCYKGVITGCNPK 60
Asp-49 Cdt       SLLQFNKMIKFETRKNVPPYAFYGCYCGWGGQGRPKDATDRCCFVHICCCYKGLAKCNTK 60
.* :.:*:      : . * *** ** * *.:*****:*.****.: ** *

Lys-49 Bjussu      KDRYS--YSWKDKTIVCGENNPCCLKELCECDKAVAI CLRNLGTYNKKYRYHLKPFCKK- 117
Asp-49 Bj         TDSYTYTYSEENGDVVCGGDDLCKKQICECDRVAATCFRDNKDTYDTKYWLYGAKNCQEE 120
Asp-49 Cdt       WDIYR--YSLKSGYITCGKGTWCKEQICECDRVAECLRRSLSTYKNEYMFYPSRCREP 118
* * ** :. :.** . * :.:***** * * . .*****: * : **

Lys-49 Bjussu      ADPC 121
Asp-49 Bj         SEPC 124
Asp-49 Cdt       SETC 122
:: *

```



De acordo com os resultados de interação apresentados pelo dicróismo circular, essas alterações nas composições de aminoácidos refletem nas estruturas secundárias das duas PLA₂ estudadas (Asp-49 e Lys-49), como por exemplo, na composição de estruturas antiparalelas e estruturas desordenadas (**Figura 17 e 18, Tabela 3**). Além disso, quando ambas as PLA₂ foram pré-incubadas com o γ BjPLI, não foram observadas alterações significativas nos espectros. Porém, pode-se observar alteração nas porcentagens das estruturas secundárias de folhas beta antiparalelas e estruturas desordenadas da Asp-49.

Oliveira e colaboradores (2011), ao analisarem os espectros de dicróismo circular do γ PLI de *B. jararacussu* incubado com uma PLA₂ também não observaram diferenças significativas nas estruturas secundárias, porém descrevem uma redução na absorbância a 222 nm, que sugere uma perda de estruturas α -hélices do inibidor. Enquanto o γ PLI de *C. d. terrificus*, quando incubado com a PLA₂ Asp-49, também apresentou espectros de dicróismo circular sem alterações significativas, porém com um aumento (3,6 %) da quantidade de

elementos desordenados, o qual o autor atribuiu a desenovelção de algumas regiões do γ PLI ao se complexar com a PLA₂ (FERNANDES, 2013).

Comparando-se o potencial de inibição das atividades edematogênica e miotóxica causado pelas PLA₂ Asp-49 e Lys-49, pode-se observar que o γ BjPLI apresentou maior eficiência para inibir as atividades miotóxicas e edematogênicas da PLA₂ Asp-49, uma vez que foi demonstrado que o γ BjPLI inibiu a atividade miotóxica da PLA₂ Asp-49 em 19,6% e da PLA₂ Lys-49 16%, enquanto na atividade edematogênica inibiu a PLA₂ Asp-49 em 38,5% e da PLA₂ Lys-49 em 19,6%.

Alguns autores acreditam que um dos dois domínios ricos em cisteína dos γ PLI se liga ao *loop* de ligação ao cálcio, o que pode explicar a sua maior afinidade por PLA₂ Asp-49, já que elas possuem este sítio mais conservado (NOBUHISA et al., 1998). Porém, em relação ao mecanismo de interação entre inibidor-PLA₂, novos estudos ainda precisam ser realizados.

Sendo assim, estes resultados fortalecem a tese de que inibidores naturais de PLA₂ da classe γ , possuem maior afinidade e eficácia frente às atividades de PLA₂ Asp-49, mesmo que ambas não necessitem necessariamente desses aminoácidos para a manutenção dessas atividades farmacológicas estudadas (BUSTILLO et al., 2019; MORA-OBANDO et al., 2014; XIAO et al., 2017).

O potencial promissor deste inibidor na neutralização da ação tóxica das PLA₂ dos venenos de serpentes e da reduzida recuperação no isolamento do plasma, motivou-nos a buscar a produção do γ BjPLI na forma recombinante. Recentemente, estudos direcionados ao potencial biotecnológico de γ PLI foi descrito por Zhang e colaboradores, (2018), ao demonstrar que o γ PLI de *Sinonatrix annularis* possui efeitos anti-inflamatórios, bloqueando uma série de PLA₂ (IB, IIA, V e X), obtendo maior porcentagem de inibição da inflamação do que os apresentados pela Dexametasona, um corticosteroide comumente utilizado na indústria farmacêutica.

Com isso, além do entendimento do mecanismo de interação entre o γ BjPLI e as diferentes isoformas de PLA₂, o estudo do γ BjPLI pode representar uma alternativa para o desenvolvimento de novas terapias que suplementem os antivenenos, os quais ainda apresentam baixa eficácia frente aos efeitos locais de constituintes do veneno de serpentes. Ainda, pode contribuir para o desenvolvimento de novas terapias para combater coagulopatias e doenças inflamatórias nas quais as PLA₂ estão envolvidas, além de sua importância no estudo biológico e evolutivo das serpentes.

Porém, devido ao baixo rendimento na obtenção desses inibidores, faz-se necessário o investimento no estudo da padronização da produção destes PLIs na forma recombinante, para que facilite o estudo da estrutura e função em experimentos que exigem maiores quantidades de proteína, como a cristalografia, além de, futuramente, poderem ser usados como um produto biotecnológico.

Deste modo, alguns estudos demonstraram a expressão recombinante de PLIs. Dentre as espécie já descritas, estão os inibidores das serpentes *Agkistrodon blomhoffi siniticus*, *Sinonatrix annularis*, *Elaphe carinata*, *B. alternatus* e *Crotalus durissus collilineatus* (GIMENES et al., 2020; LE et al., 2015; OKUMURA et al., 1999b; SANTOS-FILHO et al., 2014; SUN et al., 2018). Porém, ainda não foi estabelecido um protocolo que seja capaz de produzir os PLIs na forma recombinante e que mantivesse a estrutura e função semelhantes aos purificados de plasma.

Para isso, a estratégia utilizada na produção do γ BjPLI recombinante foi inserir o fragmento correspondente ao γ BjPLI, amplificado de uma biblioteca de cDNA, em um plasmídeo do tipo pET28a, que já tinha sido utilizado na produção do γ PLI de *Sinonatrix annularis* e *Elaphe carinata*, e expressar essa molécula utilizando a cepa *SHuffle* de *E. coli* (LE et al., 2015; SUN et al., 2018).

Ao amplificar o fragmento correspondente à sequência de γ BjPLI, foram identificadas bandas de 543 pb, valor semelhante ao encontrado por Estevão-Costa e colaboradores (2008) em *B. jararaca*, *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. Para facilitar o processo de clonagem, o fragmento γ BjPLI foi previamente inserido no vetor pGEM-T *easy*, que não necessita que as extremidades sejam clivadas com enzimas de restrição para a ligação, já que possui desoxitimidina em ambas as extremidades e consegue se ligar aos produtos de PCR pela T4 ligase. Mesmo utilizando-se o vetor pGEM-T *easy* como vetor de clonagem, foram identificadas poucas colônias positivas, sendo que das 20 testadas, apenas 2 possuíam fragmentos correspondentes ao γ BjPLI. Dessas duas colônias positivas, apenas uma estava com a sequência esperada (colônia 18), pois a colônia 12 possuía a alteração no aminoácido 57, na qual trocava uma glicina (G) por um glutamato (E), este último ainda não descrito nessa posição em γ PLI de serpentes do gênero *Bothrops* em uma pesquisa por sequências semelhantes no BLAST, mas encontrado em γ PLI de *Elaphe climacophora*, *Notechis scutatus*, *Naja atra* e *Pseudonaja textilis*.

O fragmento γ BjPLI, obtido da colônia 18 foi clonado no vetor de expressão pET28a, que faz parte dos plasmídeos do sistema pET e possuem um gene que confere resistência nucleotídica na região N- ou C- terminal do sítio de múltipla clonagem que codifica seis histidinas denominadas *His-tag*, o que facilita a purificação da proteína recombinante utilizando-se colunas de afinidade contendo metal. Sendo assim, a massa da proteína recombinante seria de 22682 Da, um pouco maior do que a estimada para a proteína nativa de 22069 Da.

Em um artigo recente, são descritos entre os aminoácidos 4-9, 19-27, 79-86, e 158-161 possíveis sítios responsáveis pela atividade inibitória do γ PLI de *B. atrox* (SOBRINHO et al., 2019). Já que as regiões da estrutura secundária do γ BjPLI que estão relacionadas com a atividade biológica e inibitória ainda não estão determinadas, novos estudos precisam ser feitos para a elucidação do aparecimento de modificações importantes causadas pela inserção desta cauda de histidina no γ BjPLI recombinante. Além disso, existe a possibilidade desta cauda ser clivada pelo uso da enzima trombina.

Gimenes e colaboradores (2020) optaram por produzir o rec γ CdcPLI, γ PLI recombinante originalmente de *C. d. collilineatus*, utilizando o vetor pHis-Parallel 2, sem cauda de histidina e fazer a purificação em uma coluna de afinidade com a PLA₂, assim como tem sido feito para obter os inibidores naturais presentes no plasma ou soro. O mesmo pode ser feito na produção do γ BjPLI recombinante, já que o γ BjPLI nativo também tem sido purificado por afinidade a PLA₂ (SERINO-SILVA et al., 2018).

Devido ao grande número de resíduos de cisteínas e conseqüentemente pontes dissulfetos presentes em inibidores da classe γ , incluindo o γ BjPLI, a expressão do γ BjPLI recombinante foi feita utilizando a cepa *SHuffle* de *E. coli*, que é capaz de produzir grandes quantidades da proteína de interesse, mantendo as modificações pós-traducionais necessárias para o dobramento correto e manutenção da estabilidade e atividade (LOBSTEIN et al., 2016).

A indução da expressão do γ BjPLI recombinante utilizando o IPTG, um indutor químico, não mostrou diferença entre as duas concentrações avaliadas, mostrando que 0,1 mM (valor para a concentração final) é suficiente para induzir o γ BjPLI recombinante. Porém, a produção da proteína recombinante a 37 °C por 16 h fez com que as proteínas fossem expressas na forma de corpos de inclusão, deixando a maior parte das proteínas insolúveis mesmo em grandes concentrações de ureia, o que futuramente pode dificultar a solubilização e purificação.

Para isso, novas padronizações devem ser feitas. A diminuição da temperatura durante a expressão é um dos principais parâmetros que deve ser revisto, já que menores temperaturas podem diminuir a taxa de expressão, porém podem produzir proteínas mais estáveis (SCHEIN, 1991).

Caso as proteínas ainda sejam produzidas de forma insolúvel, existem algumas metodologias já descritas para a recuperação de proteínas presentes em corpos de inclusão, que podem ser utilizadas como por exemplo: (1) meios físicos, submetendo a amostra sob altas pressões, altas diferenças de temperaturas ou sonicação; (2) meios biológicos, com a adição de enzimas, como a lisozima ou a lise pela proteína e (3) meios químicos, com a adição de álcool ou detergentes. Porém, a utilização de alguns desses métodos pode causar a desestabilização da estrutura da proteína, fazendo com que sejam necessários a adição de métodos de *refolding* no protocolo (PATRA et al., 2000; SINGH et al., 2015; SINGH; PANDA, 2005; SINGHVI et al., 2020; TSUMOTO et al., 2004).

Com isso, pode-se concluir que, em relação à clonagem e expressão do γ BjPLI, o γ PLI de *B. jararaca* foi clonado e expresso utilizando o vetor pET28a e a cepa de expressão *SHuffle* da espécie de bactéria *E. coli*, porém ainda necessita o estabelecimento de protocolos para o aumento da expressão do γ BjPLI de forma solúvel, bem como sua purificação.

6. Conclusões

A análise da composição do plasma de serpentes da espécie *B. jararaca* em diferentes idades (neonatos, jovens e adultos), mostrou proteínas com massa em torno de 25 kDa que interagem com o veneno bruto da própria serpente. Em todas as amostras de plasma foram identificados α PLI, β PLI, γ PLI (incluindo o γ BjPLI) e fatores anti-hemorrágicos, que são proteínas descritas como responsáveis pela proteção contra o autoenvenenamento, no entanto não foram encontradas variações ontogenéticas significativas.

Além disso, o γ BjPLI isolado do soro de *B. jararaca* demonstrou ser um inibidor natural promissor ao inibir importantes atividades provocadas por PLA₂ de serpentes distintas e com particularidades funcionais diferentes, que não são bem neutralizadas pelo tratamento antiveneno atual, como a atividade anticoagulante provocada pela crotoxina de *C. d. terrificus* e as atividades miotóxica e edematogênica da PLA₂ Asp-49 da serpente *C. d. terrificus* e da PLA₂ Lys-49 isolada da serpente *B. jararacussu*,

Por fim, a clonagem e expressão do γ BjPLI na forma recombinante, utilizando a cepa de expressão *SHuffle* da espécie de bactéria *E. coli* foi realizada com sucesso que pode futuramente pode auxiliar na obtenção de maiores quantidade desse inibidor e facilitar o estudo dessa e de outras proteínas com potencial biotecnológico na inibição das atividades provocadas por PLA₂.

Referências

- ABREU, T. F. et al. Peptidomics of *Acanthoscurria gomesiana* spider venom reveals new toxins with potential antimicrobial activity. **Journal of Proteomics**, v. 151, p. 232–242, 2017.
- ALAPE-GIRON, A. et al. Snake Venomics of the Lancehead Pitviper *Bothrops asper*: Geographic, Individual, and Ontogenetic Variations. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p. 3556–3571, 2008.
- ALBULESCU, L. et al. The Search for Natural and Synthetic Inhibitors That Would Complement Antivenoms as Therapeutics for Snakebite Envenoming. p. 1–30, 2021.
- ALBULESCU, L. O. et al. A therapeutic combination of two small molecule toxin inhibitors provides broad preclinical efficacy against viper snakebite. **Nature Communications**, v. 11, n. 1, p. 1–14, 2020.
- ALMAGRO ARMENTEROS, J. J. et al. SignalP 5.0 improves signal peptide predictions using deep neural networks. **Nature Biotechnology**, v. 37, n. 4, p. 420–423, 2019.
- ALMEIDA-SANTOS, S. M. Modelos Reprodutivos em Serpentes: estocagem de esperma e placentação em *Crotalus durissus* e *Bothrops jararaca*. p. 206, 2005.
- ANDRADE DENIS V.; ABE, A. S. Relationship of Venom Ontogeny and Diet in *Bothrops*. **Herpetologica**, v. 55, n. 2, p. 200–204, 1999.
- AOKI, N. et al. Properties and cDNA cloning of antihemorrhagic factors in sera of Chinese and Japanese mamushi (*Gloydius blomhoffi*). **Toxicon**, v. 51, n. 2, p. 251–261, 2008.
- ARAYA, C. et al. Antitumor effects of cationic synthetic peptides derived from Lys49 phospholipase A2 homologues of snake venoms. v. 31, p. 263–268, 2007.
- ARBUCKLE, K.; RODRÍGUEZ DE LA VEGA, R. C.; CASEWELL, N. R. Coevolution takes the sting out of it: Evolutionary biology and mechanisms of toxin resistance in animals. **Toxicon**, v. 140, p. 118–131, 2017.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2--a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827–41, 1996.
- BASTOS, V. A. et al. Natural inhibitors of snake venom metalloendopeptidases: History and current challenges. **Toxins**, v. 8, n. 9, 2016.
- BEGHINI, D. G. et al. Enzymatic characterization of a novel phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* rattlesnake (Maracambóia) venom. **Journal of protein chemistry**, v. 19, n. 7, p. 603–7, 2000.
- BERMÚDEZ-MÉNDEZ, E. et al. Innovative immunization strategies for antivenom development. **Toxins**, v. 10, n. 11, p. 1–37, 2018.
- BITTENCOURT RODRIGUES, C. F. et al. Boaypli: Structural and functional characterization of the gamma phospholipase A2 plasma inhibitor from the non-venomous Brazilian snake *Boa constrictor*. **PLoS ONE**, v. 15, n. 2, 2020.

BOENO, C. N. et al. Inflammasome Activation Induced by a Snake Venom Lys49-Phospholipase A2 Homologue. **Toxins**, v. 3, 2019.

BRADFORD, M. M. Bradford, M. M. **Anal. Biochem.**, v. 72, p. 248, 1976.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE - FUNASA. **Manual de Diagnóstico e Tratamento de Acidentes por Animais Peçonhentos**. 2^o ed ed. Brasília: [s.n.].

BRENO, M. C. Maintenance of the snake *Bothrops jararaca* in captivity. n. , 1990.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, n. Suppl, p. S237-42, 2009.

BUSTILLO, S. et al. Isolation of two basic phospholipases A2 from *Bothrops diporus* snake venom: Comparative characterization and synergism between Asp49 and Lys49 variants. **Toxicon**, v. 168, p. 113–121, 2019.

CALVETE, J. J. et al. Snake population venomomics and antivenomics of *Bothrops atrox*: Paedomorphism along its transamazonian dispersal and implications of geographic venom variability on snakebite management. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 4, p. 510–527, 2011.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. **Snake venomomics. Strategy and applications**. Journal of Mass Spectrometry. **Anais**. 2007

CÂMARA, G. A. et al. A Multiomics Approach Unravels New Toxins With Possible In Silico Antimicrobial, Antiviral, and Antitumoral Activities in the Venom of *Acanthoscurria rondoniae*. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1–14, 2020.

CAMPBELL, JONATHAN A.LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of the western hemisphere**. Ithaca and London: CORNELL UNIVERSITY PRESS, 2004.

CAMPOS, P. C. et al. Endogenous phospholipase A2 inhibitors in snakes: a brief overview. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 22, n. 1, p. 37, 2016.

CARDOSO, J. L. C. et al. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers (*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brazil. **Qjm**, v. 86, n. 5, p. 315–325, 1993.

CARDOSO, J. L. C. et al. **Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. São Paulo: 2001.

CASEWELL, N. R. et al. Medically important differences in snake venom composition are dictated by distinct postgenomic mechanisms. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 25, p. 9205–9210, 2014.

CEDRO, R. C. A. et al. Cytotoxic and inflammatory potential of a phospholipase A2 from *Bothrops jararaca* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 1–14, 2018.

CHIPPAUX, J. P. Snake-bites: Appraisal of the global situation. **Bulletin of the World Health Organization**, v. 76, n. 5, p. 515–524, 1998.

CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 38, 2017.

CINTRA, A. C. O. et al. Bothropstoxin-I: Amino acid sequence and function. **Journal of Protein Chemistry**, v. 12, n. 1, p. 57–64, 1993.

CLARE, R. H. et al. Small Molecule Drug Discovery for Neglected Tropical Snakebite. **Trends in Pharmacological Sciences**, v. 42, n. 5, p. 340–353, 2021.

CUMMINGS, B. S.; MCHOWAT, J.; SCHNELLMANN, R. G. Phospholipase A2 s in Cell Injury and Death. **The Journal of Pharmacology and Experimental Therapeutics**, v. 294, n. 3, p. 793–799, 2000.

CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. P.; SUDO, L. S. Edematogenic responses induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: role of lymphocytes. **Toxicon**, v. 32, n. 11, p. 1425–1431, 1994.

DA SILVA AGUIAR, W. et al. Comparative compositional and functional analyses of *Bothrops moojeni* specimens reveal several individual variations. **PLoS ONE**, v. 14, n. 9, p. 1–26, 2019.

DE MORAIS-ZANI, K. et al. Proteomic Analysis of the Ontogenetic Variability in Plasma Composition of Juvenile and Adult *Bothrops jararaca* Snakes. **International Journal of Proteomics**, v. 2013, p. 1–9, 2013.

DE WIT, C. A.; WESTRÖM, B. R. Venom resistance in the Hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagic factors. **Toxicon**, v. 25, n. 3, p. 315–323, 1987.

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

DOS SANTOS, J. et al. The Intriguing Phospholipases A2 Homologues: Relevant Structural Features on Myotoxicity and Catalytic Inactivity. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 887–893, 2009.

DURBAN, J. et al. Integrated “omics” profiling indicates that miRNAs are modulators of the ontogenetic venom composition shift in the Central American rattlesnake, *Crotalus simus simus*. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 1–17, 2013.

EDWARD HARLOW, DAVID LANE, E. H. D. L. **Antibodies: A Laboratory Manual**. ilustrada ed. [s.l.] CSHL Press, 1988.

ESTEVÃO-COSTA, M. I. et al. Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous gamma-phospholipase A2 inhibitors in Brazilian *Bothrops* snakes (Viperidae, Crotalinae). **Toxicon**, v. 52, n. 1, p. 122–9, 2008.

ESTEVÃO-COSTA, M. I. et al. Structural and evolutionary insights into endogenous alpha-phospholipase A2 inhibitors of Latin American pit vipers. **Toxicon**, v. 112, n. 2016, p. 35–44, 2016.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved

in the stability and toxicity of this potent heterodimeric β -neurotoxin. **Journal of molecular biology**, v. 412, n. 2, p. 176–91, 2011.

FERNANDES, C. **Estudos estruturais com fosfolipases A2 isoladas de venenos de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus**. [s.l.] Universidade Estadual Paulista, 2013.

FERNANDES, C. A. H. et al. Biophysical studies suggest a new structural arrangement of crotoxin and provide insights into its toxic mechanism. **Scientific Reports**, v. 7, n. November 2016, p. 1–15, 2017.

FITA, D. S.; NETO, E. M. C.; SCHIAVETTI, A. “Offensive” snakes: cultural beliefs and practices related to snakebites in a Brazilian rural settlement. **Journal of Ethnobiology and Ethnomedicine**, v. 6, p. 1–13, 2010.

FONTANA, F. Traité sur le vénéin de la vipere, sur les poisons americains, sur le laurier-cerise et sur quelques autres poisons vegetaux. In: On y a joint des observations sur la structure primitive du corps animal. Différentes expériences sur la reproduction des nerf. **Florence**, p. 23, 1781.

FORTES-DIAS, C. L. et al. A Phospholipase A2 , Inhibitor from the Plasma of the South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Journal of Biological Chemistry**, v. 269, n. 22, p. 15646–15651, 1994.

FORTES-DIAS, C. L. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A2 in the blood plasma of snakes. **Toxicon**, v. 40, n. 5, p. 481–484, 2002.

FORTES-DIAS, C. L. et al. Identification, description and structural analysis of beta phospholipase A 2 inhibitors (sb β PLIs) from Latin American pit vipers indicate a binding site region for basic snake venom phospholipases A2. **Toxicon: X**, v. 2, n. September 2018, p. 100009, 2019.

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

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

FRY, B. G. From genome to “venome”: molecular origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences and related body proteins. **Genome research**, v. 15, n. 3, p. 403–20, 2005.

FURTADO, M. F. D. et al. Comparative study of nine Bothrops snake venoms from adult female snakes and their offspring. **Toxicon**, v. 29, n. 2, p. 219–226, 1991.

GEORGIEVA, D. et al. Snake venom of *Crotalus durissus terrificus*-correlation with pharmacological activities. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 5, p. 2302–2316, 2010.

GIANAZZA, E. et al. With or without you - Proteomics with or without major plasma/serum proteins. **Journal of Proteomics**, v. 140, p. 62–80, 2016.

GIBBS, H. L. et al. The molecular basis of venom resistance in a rattlesnake-squirrel predator-prey system. **Molecular Ecology**, n. June, p. 1–18, 2020.

GIBBS, H. L.; MACKESSY, S. P. Functional basis of a molecular adaptation: Prey-specific toxic effects of venom from *Sistrurus rattlesnakes*. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 672–679, 2009.

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

GIMENES, S. N. C. et al. Biochemical and functional characterization of a new recombinant phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 164, p. 1545–1553, 2020.

GIMENEZ, B. T. et al. Role of crotoxin in coagulation: Novel insights into anticoagulant mechanisms and impairment of inflammation-induced coagulation. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, n. November, p. 1–12, 2021.

GOLDSTEIN, E. et al. Integrating human behavior and snake ecology with agent-based models to predict snakebite in high risk landscapes. p. 1–20, 2021.

GOMES, C. M. et al. Differential transcript profile of inhibitors with potential anti-venom role in the liver of juvenile and adult *Bothrops jararaca* snake. **PeerJ**, v. 5, p. e3203, 2017.

GONÇALVES-MACHADO, L. et al. Combined venomomics , venom gland transcriptomics , bioactivities , and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest . **Journal of Proteomics**, v. 135, p. 73–89, 2016.

GREGO, K. F. et al. Maintenance of venomous snakes in captivity for venom production at Butantan Institute from 1908 to the present: a scoping history. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, p. 1–11, 2021.

GUÉRCIO, R. A. P. et al. Ontogenetic variations in the venom proteome of the Amazonian snake *Bothrops atrox*. **Proteome science**, v. 4, n. 1, p. 11, 2006.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Trends in Snakebite Envenomation Therapy: Scientific, Technological and Public Health Considerations. **Current pharmaceutical design**, v. 13, n. February 2007, p. 2935–2950, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Unresolved issues in the understanding of the pathogenesis of local tissue damage induced by snake venoms. **Toxicon**, v. 148, p. 123–131, 2018.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 976–987, 2009.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem. Inst. Butantan**, v. 51, n. 4, p. 211–223, 1989.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, p. 27–39, 2013.

GUTIÉRREZ, J. M.; THEAKSTON, G.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: The need for a global partnership. **PLoS Medicine**, v. 3, n. 6, p. 0727–0731, 2006.

HABERMANN, E.; BREITHAUPT, H. Mini-Review: The crotoxin complex- an example of biochemical and pharmacological protein complementation. **Toxicon**, v. 16, n. 1970, p. 19–30, 1978.

HARRISON, R. A. et al. Snake envenoming: A disease of poverty. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 3, n. 12, 2009.

HARRISON, R. A. et al. Preclinical antivenom-efficacy testing reveals potentially disturbing deficiencies of snakebite treatment capability in East Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 10, p. 1–24, 2017.

HARTMANN, P. A.; HARTMANN, M. T.; GIASSON, L. O. M. Uso do hábitat e alimentação em juvenis de *Bothrops jararaca* (Serpentes, Viperidae) na Mata Atlântica do sudeste do Brasil. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, v. 2, n. 1, p. 35, 2003.

HATAKEYAMA, D. M. et al. From birth to adulthood: An analysis of the Brazilian lancehead (*Bothrops moojeni*) venom at different life stages. **PLoS ONE**, v. 16, n. 6 June, p. 1–24, 2021.

HELOISE, P. et al. BthTX-I from *Bothrops jararacussu* induces apoptosis in human breast cancer cell lines and decreases cancer stem cell subpopulation. p. 1–9, 2019.

HOLDING, M. L. et al. Venom Resistance as a Model for Understanding the Molecular Basis of Complex Coevolutionary Adaptations. **Integrative and Comparative Biology**, v. 56, n. 5, p. 1032–1043, 2016.

HOLZER, M.; MACKESSY, S. P. An aqueous endpoint assay of snake venom phospholipase A2. **Toxicon**, v. 34, n. 10, p. 1149–55, 1996.

HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. et al. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom: Partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v. 26, n. 7, p. 615–627, 1988.

IVAN SAZIMA. Natural history of the jararaca pitiviper, *Bothrops jaraca*, in southeastern Brazil. In: JONATHAN A. CAMPBELL & EDMUND D. BRODIE (Ed.). **Biology of pitivipers**. 1st. ed. [s.l.] Selva, 1992.

JOSEPH, J. S. et al. Effect of snake venom procoagulants on snake plasma: implications for the coagulation cascade of snakes. **Toxicon: official journal of the International Society on Toxinology**, v. 40, n. 2, p. 175–83, 2002.

JUÁREZ, P.; SANZ, L.; CALVETE, J. J. Snake venomomics: characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. **Proteomics**, v. 4, n. 2, p. 327–38, 2004.

KASHIMA, S. et al. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211–219, 2004.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613–635, 1989.

KINKAWA, K. et al. Up-regulation of the expressions of phospholipase A2 inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A2. **Biochemical and Biophysical**

Research Communications. 2010.

KOUASSI, K. J. E. et al. Amputation de membre secondaire à une morsure de vipère. **Archives de Pédiatrie**, p. 350–352, 2017.

KOUYOUMDJIAN, J. A.; HARRIS, J. B.; JOHNSON, M. A. Muscle necrosis caused by the sub-units of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, n. 6, p. 575–583, 1986.

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

LALLOO, D. G.; THEAKSTON, R. D. G. Snake Antivenoms. **Journal of Toxicology: Clinical Toxicology**, v. 41, n. 3, p. 277–290, 5, 2003.

LANDOVÁ, E. et al. Association between fear and beauty evaluation of snakes: Cross-cultural findings. **Frontiers in Psychology**, v. 9, n. MAR, p. 1–15, 2018.

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

LE, Z. et al. Orthogonal optimization of prokaryotic expression of a natural snake venom phospholipase A2 inhibitor from *Sinonatrix annularis*. **Toxicon**, v. 108, p. 264–271, 2015.

LEWIN, M. et al. Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A2 and a possible pre-referral treatment for envenomation. **Toxins**, v. 8, n. 9, 2016.

LI, L.; HUANG, J.; LIN, Y. Snake venoms in cancer therapy: Past, present and future. **Toxins**, v. 10, n. 9, p. 1–8, 2018.

LIZANO, S. et al. Biochemical characterization and pharmacological properties of a phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. **The Biochemical journal**, v. 326 (Pt 3, n. 1997, p. 853–9, 1997.

LIZANO, S. et al. Two Phospholipases A2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation molecular cloning and biological properties. **Biochem. J.**, v. 639, p. 631–639, 2000.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipase A2 myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 963–977, 2003.

LOBSTEIN, J. et al. SHuffle, a novel *Escherichia coli* protein expression strain capable of correctly folding disulfide bonded proteins in its cytoplasm. **Microbial Cell Factories**, v. 15, n. 1, p. 1–16, 2016.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERÓN, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885–901, 2003.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; MORENO, E. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A 2 Homologues from Viperidae Snake Venoms : Biomimetic

Activities and Potential Applications. p. 3224–3230, 2010.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A2 from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, n. 4, p. 647–659, 2011.

LUNA, M. S. A. et al. Sympathetic outflow activates the venom gland of the snake *Bothrops jararaca* by regulating the activation of transcription factors and the synthesis of venom gland proteins. **Journal of Experimental Biology**, v. 212, n. 10, p. 1535–1543, 2009.

MACHADO BRAGA, J. R. et al. Sexual and ontogenetic variation of *Bothrops leucurus* venom. **Toxicon**, v. 184, p. 127–135, 2020.

MADEIRA, F. et al. The EMBL-EBI search and sequence analysis tools APIs in 2019. **Nucleic Acids Research**, v. 47, n. W1, p. W636–W641, 2019.

MADUWAGE, K.; ISBISTER, G. K. Current Treatment for Venom-Induced Consumption Coagulopathy Resulting from Snakebite. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, 2014.

MARKLAND, F. S. Snake Venoms And The Hemostatic System. v. 36, n. 12, 1998.

MARTINS, M. M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and Phylogenetic Correlates of Feeding Habits in Neotropical Pitvipers of the Genus *B. Othrops*. **Biology of the Vipers**, v. 592, n. 1992, p. 307–328, 2002.

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

MENCHACA, J. M.; PEREZ, J. C. The purification and characterisation of an anti-haemorrhagic factor in Opossum {I(*Didelphis virginiana*)}. **Toxicon**, v. 19, n. 5, p. 623–632, 1981.

MENEZES, M. C. et al. Sex-based individual variation of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon**, v. 47, n. 3, p. 304–312, 2006.

MORA-OBANDO, D. et al. Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, 2014.

MURAKAMI, M. T. et al. Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. **Journal of Molecular Biology**, v. 350, n. 3, p. 416–426, 2005.

NAKASHIMA, K. et al. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 92, n. 12, p. 5605–5609, 1995.

NICOLAU, C. A. et al. An in-depth snake venom proteopeptidome characterization: Benchmarking *Bothrops jararaca*. **Journal of Proteomics**, v. 151, n. 2017, p. 214–231, 2016.

NOBUHISA, I. et al. Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase A2 isozymes. **FEBS Letters**, v. 429, n. 3, p. 385–389, 1998.

OGUIURA, N. et al. Quantification of crostamine, a small basic myotoxin, in South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) venom by enzyme-linked immunosorbent assay with parallel-lines analysis. **Toxicon**, v. 38, n. 3, p. 443–448, 2000.

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

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

OHKURA, N. et al. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **The Biochemical journal**, v. 325 (Pt 2, p. 527–31, 1997.

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

OKUMURA, K. et al. Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A2 inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. **The Biochemical journal**, v. 341, p. 165–71, 1999a.

OKUMURA, K. et al. cDNA cloning and bacterial expression of phospholipase A(2) inhibitor PLIalpha from the serum of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Biochimica et biophysica acta**, v. 1441, n. 1, p. 51–60, 1999b.

OLIVEIRA, A. K. et al. Simplified procedures for the isolation of HF3, bothropasin, disintegrin-like/cysteine-rich protein and a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops jararaca* venom. **Toxicon**, v. 53, n. 7–8, p. 797–801, 2009.

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

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

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

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Rabies and envenomings : a neglected public health issue : report of a consultative meeting**. [s.l.] Geneva : World Health Organization, 2007.

PARENTE, L. Pros and cons of selective inhibition of cyclooxygenase-2 versus dual lipoxygenase/cyclooxygenase inhibition: Is two better than One? **Journal of Rheumatology**, v. 28, n. 11, p. 2375–2382, 2001.

PASSOS, J. Influência no crescimento de *Bothrops insularis* e *Bothrops jararaca*: a dieta pode

interferir no tamanho da maturidade sexual em cativo? 2018.

PATRA, A. K. et al. Optimization of inclusion body solubilization and renaturation of recombinant human growth hormone from *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 18, n. 2, p. 182–192, 2000.

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

PEREIRA, L. DE M. et al. In-depth transcriptome reveals the potential biotechnological application of *Bothrops jararaca* venom gland. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, 2020.

PÉREZ, J. C.; SÁNCHEZ, E. E. Natural protease inhibitors to hemorrhagins in snake venoms and their potential use in medicine. **Toxicon**, v. 37, n. 5, p. 703–728, 1999.

PIERINI, S. V. et al. High incidence of bites and stings by snakes and other animals among rubber tappers and Amazonian Indians of the Jurua valley, acre state, Brazil. **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 225–236, 1996.

PLA, D.; RODRÍGUEZ, Y.; CALVETE, J. J. Third generation antivenomics: Pushing the limits of the in vitro preclinical assessment of antivenoms. **Toxins**, v. 9, n. 5, 2017.

PREZOTO, B. C. et al. A functional and thromboelastometric-based micromethod for assessing crotoxin anticoagulant activity and antiserum relative potency against *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 148, p. 26–32, 2018.

PREZOTO, B. C.; OGUIURA, N. Factor XII-Deficient Chicken Plasma as a Useful Target for Screening of Pro- and Anticoagulant Animal Venom Toxins. **Toxins**, v. 12, n. 2, p. 1–11, 2020.

RANÉIA E SILVA, P. A. et al. Inflammatory effect of Bothropstoxin-I from *Bothrops jararacussu* venom mediated by NLRP3 inflammasome involves ATP and P2X7 receptor. **Clinical Science**, v. 135, n. 5, p. 687–701, 2021.

RODRIGUES, C. F. B. et al. BoayPLI from Boa constrictor Blood is a Broad-Spectrum Inhibitor of Venom PLA2 Pathophysiological Actions. **Journal of Chemical Ecology**, n. 0123456789, 2021.

S.R.T. CARDOSO. **Estratégias reprodutivas de Bothrops jararaca (Serpentes: Viperidae)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2001.

SALDARRIAGA, M. M. et al. Ontogenetic variability of *Bothrops atrox* and *Bothrops asper* snake venoms from Colombia. **Toxicon**, v. 42, n. 4, p. 405–411, 2003.

SALVADOR, G. H. M. et al. Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism. **Scientific Reports**, v. 8, n. 1, p. 1–15, 2018.

SAMPAIO, S. C. et al. Crotoxin: Novel activities for a classic β -neurotoxin. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1045–1060, 2010.

SANTORO, M. L. et al. Ontogenetic variation in biological activities of venoms from hybrids between bothrops erythromelas and *Bothrops neuwiedi* snakes. **PLoS ONE**, v. 10, n. 12, p. 1–22, 2015.

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

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. **Biochimie**, v. 93, n. 3, p. 583–592, 2011.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Heterologous expression and biochemical and functional characterization of a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake. **Biochimie**, v. 105, p. 119–128, 2014.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. rBaltMIP, a recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* (*Rhinocerophis alternatus*) snake, as a potential candidate to complement the antivenom therapy. **Toxicon**, v. 124, p. 53–62, 2016.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. Understanding the mechanism of action of peptide (p-BthTX-I)2 derived from C-terminal region of phospholipase A2 (PLA2)-like bothropstoxin-I on Gram-positive and Gram-negative bacteria. **Toxicon**, v. 2, 2021.

SANTOS, P. E. B. et al. Effects of crotoxin on the isolated guinea pig heart. **Toxicon**, v. 28, n. 2, p. 215–224, 1990.

SAÚDE, MINISTÉRIO DA. **Acidentes por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinanet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 15 ago. 2021.

SCHEIN, C. H. Optimizing protein folding to the native state in bacteria. **Current Opinion in Biotechnology**, v. 2, n. 5, p. 746–750, 1991.

SCHNEIDER, M. C. et al. Overview of snakebite in Brazil: Possible drivers and a tool for risk mapping. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 15, n. 1, p. 1–18, 2021.

SCOTT, D. L. et al. Crystallographic and biochemical studies of the (inactive) Lys-49 phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon piscivorus piscivorus*. **Journal of Biological Chemistry**, v. 267, n. 31, p. 22645–22657, 1992.

SCOTT, D. L. et al. Interfacial Catalysis: The Mechanism of Phospholipase A2. **Science**, v. 148, n. 6, p. 895–901, 2010.

SERINO-SILVA, C. et al. Purification and characterization of the first γ -phospholipase inhibitor (γ PLI) from *Bothrops jararaca* snake serum. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. 1–16, 2018.

SERRANO, S. M. et al. A novel phospholipase A2, BJ-PLA2, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 367, n. 1, p. 26–32, 1999.

SERRANO, S. M. T. et al. A multifaceted analysis of viperid snake venoms by two-dimensional

gel electrophoresis: an approach to understanding venom proteomics. **Proteomics**, v. 5, n. 2, p. 501–10, fev. 2005.

SINGH, A. et al. Protein recovery from inclusion bodies of *Escherichia coli* using mild solubilization process. **Microbial Cell Factories**, v. 14, n. 1, p. 1–10, 2015.

SINGH, S. M.; PANDA, A. K. Solubilization and refolding of bacterial inclusion body proteins. **Journal of Bioscience and Bioengineering**, v. 99, n. 4, p. 303–310, 2005.

SINGHVI, P. et al. Bacterial Inclusion Bodies: A Treasure Trove of Bioactive Proteins. **Trends in Biotechnology**, v. 38, n. 5, p. 474–486, 2020.

SLAGBOOM, J. et al. Haemotoxic snake venoms: their functional activity, impact on snakebite victims and pharmaceutical promise. **British Journal of Haematology**, v. 177, n. 6, p. 947–959, 2017.

SOARES, A. M. et al. A rapid procedure for the isolation of the LYS-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503–514, 1998.

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

SOARES, A. M.; ZULIANI, J. P. Toxins of Animal Venoms and Inhibitors: Molecular and Biotechnological Tools Useful to Human and Animal Health. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 21, p. 1868–1871, 2019.

SOBRINHO, J. C. et al. Antimyotoxic Activity of Synthetic Peptides Derived from *Bothrops atrox* Snake Gamma Phospholipase A2 Inhibitor Selected by Virtual Screening. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 19, n. 22, p. 1952–1961, 2019.

SOUSA, J. R. F. et al. Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents. **Toxicon**, v. 39, n. 6, p. 787–792, 2001.

STÁBELI, R. G. et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, n. 3- 4 SPEC. ISS., p. 371–381, 2006.

SUN, S. et al. High activity chimeric snake gamma-type phospholipase A2 inhibitor created by DNA shuffling. **Toxicon**, v. 153, n. May, p. 32–38, 2018.

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

TANAKA-AZEVEDO, A. M.; TANAKA, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. A new blood coagulation inhibitor from the snake *Bothrops jararaca* plasma: Isolation and characterization. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 308, n. 4, p. 706–712, 2003.

TASIMA, L. J. et al. Crotamine in *Crotalus durissus*: Distribution according to subspecies and

geographic origin, in captivity or nature. **Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases**, v. 26, n. August 2019, p. 1–14, 2020a.

TASIMA, L. J. L. J. et al. Comparative proteomic profiling and functional characterization of venom pooled from captive *Crotalus durissus terrificus* specimens and the Brazilian crotalic reference venom. **Toxicon**, v. 185, n. May, p. 26–35, 2020b.

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. K. A review and database of snake venom proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, 2017.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, n. 1, p. 67–76, 2009.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats: Role of eicosanoids and platelet activating factor (PAF). **Toxicon**, v. 32, n. 4, p. 419–426, 1994.

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

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

TOMIHARA, Y. et al. Purification of three antihemorrhagic factors from the serum of a mongoose (*Herpestes edwardsii*). **Toxicon**, v. 25, n. 6, p. 685–689, 1987.

TSUMOTO, K. et al. Role of arginine in protein refolding, solubilization, and purification. **Biotechnology Progress**, v. 20, n. 5, p. 1301–1308, 2004.

TU, A. T. **Venom Chemistry and Molecular Biology**. John Wiley ed. New York: [s.n.].

TU, A. T. **Reptile Venoms and Toxins . Handbook of Natural Toxins**. New York: Marcel Dekker, 1991.

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

VAN DEENEN, L. L. M.; DE HAAS, G. H. The substrate specificity of phospholipase A2. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 70, n. 4, p. 538–553, 1963.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. M. **Bioquímica de venenos de serpentes. In: Venenos Animais**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações científicas, 1994.

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

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

WARD, R. J. et al. Active-site mutagenesis of a Lys49-phospholipase A2: Biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. **Biochemical Journal**, v. 362, n. 1, p. 89–96, 2002.

WHITING, D.; DINARDO, J. A. TEG and ROTEM: Technology and clinical applications. **American Journal of Hematology**, v. 89, n. 2, p. 228–232, 2014.

WILLIAMS, D. J. et al. Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 13, n. 2, p. 12–14, 2019.

XIAO, H. et al. Snake Venom PLA2, a Promising Target for Broad-Spectrum Antivenom Drug Development. **BioMed Research International**, v. 2017, p. 1–10, 2017.

XIE, C. et al. Varespladib inhibits the phospholipase A2 and coagulopathic activities of venom components from hemotoxic snakes. **Biomedicines**, v. 8, n. 6, p. 1–17, 2020.

YU, B. Z.; BERG, O. G.; JAIN, M. K. The divalent cation is obligatory for the binding of ligands to the catalytic site of secreted phospholipase A2. **Biochemistry**, v. 32, n. 25, p. 6485–6492, 1993.

ZELANIS, A. et al. Analysis of the Ontogenetic Variation in the Venom Proteome / Peptidome of *Bothrops jararaca* Reveals Different Strategies to Deal with Prey. **Journal of Proteome Research**, v. 9, p. 2278–2291, 2010.

ZELANIS, A. **Proteômica e transcriptômica aplicadas ao estudo da variabilidade do veneno de *Bothrops jararaca* (Serpentes: Viperidae)**. [s.l.] Universidade de São Paulo, 2011.

ZELANIS, A. et al. *Bothrops jararaca* venom proteome rearrangement upon neonate to adult transition. **Proteomics**, v. 11, n. 21, p. 4218–4228, 2012a.

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

ZHANG, D. et al. The inhibitory effect of saPLIγ a snake sourced PLA2 inhibitor on carrageenan-induced inflammation in mice. **Toxicon**, v. 151, n. July, p. 89–95, 2018.