

**CAROLINE FABRI BITTENCOURT RODRIGUES**

**Identificação, isolamento e caracterização do inibidor de PLA<sub>2</sub>  
presente no soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor***

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 FABRI BITTENCOURT RODRIGUES**

**Identificação, isolamento e caracterização do inibidor de PLA<sub>2</sub> presente no soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor***

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: Dr<sup>a</sup> Anita Mitico Tanaka Azevedo

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)

Fabri Bittencourt Rodrigues, Caroline  
Identificação, isolamento e caracterização do  
inibidor de PLA2 presente no soro da serpente não  
peçonhenta *Boa constrictor* / Caroline Fabri  
Bittencourt Rodrigues; orientadora Anita Mitico  
Tanaka-Azevedo. -- São Paulo, 2021.  
118 p.

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

1. Fosfolipase A2. 2. Envenenamento. 3. Inibidor  
endógeno de veneno. 4. Serpente não peçonhenta. 5.  
Resistência ao envenenamento. I. Tanaka-Azevedo,  
Anita Mitico, orientador. II. Título.

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

Candidato(a): Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues

Título da Tese: Identificação, isolamento e caracterização do inibidor de PLA<sub>2</sub> presente no soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*

Orientador: Dra. Anita Mítico Tanaka Azevedo.

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 "Identificação, isolamento e caracterização de inibidor de PLA2 presente no soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*", protocolada sob o CEUA nº 6916110917 (ID 001031), sob a responsabilidade de **Anita Mítico Tanaka Azevedo e equipe; 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 22/11/2017.

We certify that the proposal "Identification, isolation and characterization of PLA2 inhibitor present in serum of non-venomous snake *Boa constrictor*", utilizing 5 Reptiles (males and females), 120 Heterogenics mice (120 males), protocol number CEUA 6916110917 (ID 001031), under the responsibility of **Anita Mítico Tanaka Azevedo and team; 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 11/22/2017.

Finalidade da Proposta: [Pesquisa](#)

Vigência da Proposta: de [09/2017](#) a [01/2020](#) Área: [Herpetologia](#)

Origem: [Animais provenientes de outros estudos](#)

Espécie: [Répteis](#) sexo: [Machos e Fêmeas](#) idade: [0 a 13 anos](#) N: [5](#)

Linhagem: [Boa constrictor](#) Peso: [1 a 3 kg](#)

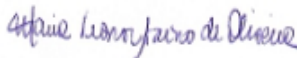
Origem: [Biotério Central](#)

Espécie: [Camundongos heterogênicos](#) sexo: [Machos](#) idade: [3 a 4 semanas](#) N: [120](#)

Linhagem: [Swiss](#) Peso: [18 a 22 g](#)

Local do experimento: Biotério central do laboratório de herpetologia

São Paulo, 29 de novembro de 2018



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



Secretaria de Estado da Saúde  
Instituto Butantan  
Laboratório de Herpetologia

**ib** butantan

São Paulo, 4 de junho de 2021.

Ilmo Sr. Prof. Dr. José Gregório Cabrera Gomez  
Presidente do Programado programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia da  
Universidade de São Paulo – USP.

Eu, **Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues**, portadora do número USP 10244189 venho por meio deste ofício declarar que os experimentos relacionados a tese de Doutorado com o tema de “Identificação, isolamento e caracterização do inibidor de PLA<sub>2</sub> presente no soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*”, cuja experimentação animal fora aprovada pelo comitê de ética de número CEUA 6916110917, Instituto Butantan, teve os experimentos envolvendo animais realizados durante a vigência da autorização do presente comitê. Deste modo, justifico que os experimentos foram concluídos durante a vigência, e portanto, o depósito da tese pode ser prosseguido.

Atenciosamente,

**Anita Mítico Tanaka Azevedo**  
Instituto Butantan  
Laboratório de Herpetologia  
E-mail: anita.azevedo@butantan.gov.br

**Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues**  
Instituto Butantan  
Laboratório de Herpetologia  
E-mail: cfabri3@gmail.com

A todos que fizeram meu caminho possível.

“O pensamento parece uma coisa à toa; mas como é que a gente voa quando começa a pensar...”

Lupicínio Rodrigues, Felicidade

“Não acredito em dom  
E tudo é tão transitório  
Só fazer comprova  
existir”

Boogarins

“Jogue as ideias no ar”

Boogarins, A Tradição.



## AGRADECIMENTOS

Agradecer é um ato sublime, é a compreensão de nossa jornada e das pessoas que, sem as quais, tal jornada não seria possível. Sempre costumo brincar que “jogo minha vida no hard”, que sempre meus caminhos são tortuosos e coisas inimagináveis acontecem. Mas, na verdade, o que mais tenho é sorte – e gratidão – exatamente por, durante minhas andanças, encontrar pessoas tão incríveis em meu cotidiano.

Primeiramente, agradeço à minha família incrível (Mãe, Tio Lucas, Pai, Ana, Vó, Vô), que sempre me apoiou e acreditou em mim quando nem eu mesma acreditava, que me acolhe e luta por mim em todos os âmbitos. Aos meus irmãos Ana Luísa e Lucas, que me fazem querer ser exemplo e que sempre me dão tanto orgulho.

Ao meu companheiro Bruno, meu consultor de estatística particular, que está do meu lado mesmo quando estamos bem longe, que compreende a ciência e minhas escolhas, que é a melhor pessoa do mundo inteiro – e que encanta a todos que conhece.

Aos meus amigos, que mesmo em contextos tão distintos sempre estiveram do meu lado, me incentivando e me fazendo ter a certeza de acolhimento. Por serem quem são e estarei aqui, cada um de sua forma.

Ao meu antigo orientador, Marcos Hikari Toyama, por me ensinar do zero os caminhos da ciência, por me lapidar, por me incentivar e ser um colaborador para todo momento mesmo que eu tenha seguido outros caminhos, pelo carinho e cuidado que o senhor tem mesmo a distância. É muito gratificante dizer que a orientação se transformou em amizade.

À minha orientadora, Anita Mítico Tanaka-Azevedo, por me acolher, por aceitar a orientação no escuro e acreditar em mim e em meu potencial. Por me fazer crescer, por me fazer cientista, conhecer novos mundos, novas técnicas. Pela postura de mãe que transforma o laboratório em família. Agradeço imensamente por tudo o que você me fez e proporcionou, e tenho certeza de que se sou uma pessoa (e cientista) melhor hoje, você é grande responsável.

À Karen de Moraes Zani, pessoa que admiro e me inspiro, a quem recorri muitas vezes para auxílio. Saiba que você é uma pesquisadora incrível, de extrema organização e critérios, de um coração gigante. Sou muito grata pelas conversas, pelo cotidiano, pelas ideias e conselhos.

À Kathleen Fernandes Grego, diretora do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, a qual possui uma postura admirável, impecável. É lindo ver seu trabalho e a maestria com que dirige o laboratório. Agradeço imensamente pela gentileza, e por ter permitido que essa tese se desenvolvesse. Obrigada pela retirada de sangue da *Boa constrictor*.

A todos os funcionários do Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan, por serem fundamentais para que os trabalhos se desenvolvam de forma eficaz. Pelo amor aos animais e a maestria no cuidado. Ao Marcelo Pires Nogueira de Carvalho pela disponibilidade em retirar sangue da *Boa constrictor*.

À Caroline Serino, minha companheira de nome e pesquisa. Pela sua generosidade incrível, pela parceria de laboratório e da vida. Obrigada! Por me acolher, por ter paciência, por ser um ponto de equilíbrio na minha personalidade caótica. Não sei se você tem ideia do quão importante é, e de como equilibra a todos. Foi (e é) incrível nossa jornada, aprender contigo, errar contigo, construir esse trabalho com você como dupla. Obrigada por resolver problemas e ser uma incrível ouvinte, obrigada pelos duetos durante a purificação de afinidade. Você está aqui, e sempre estará.

À Nathália Galízio, pela amizade, pelos debates, pelo profundo talento e conhecimento dentro da pesquisa. Obrigada por lembrar de todas as referências, pela escrita, pelas boas ideias. Obrigada pelo apoio, pelas conversas, pela parceria no laboratório e fora dele. Pelos shows. Sempre me admiro pelo seu talento e fico muito feliz de ver o quanto você se debruça intensamente naquilo que gosta. Obrigada pela empolgação.

Ao Weslei Aguiar, meu gêmeo que desde a primeira vez que conheci (na verdade antes de conhecer) já tive como um amigo antigo. Obrigada pelo companheirismo, pelas risadas, pelas músicas, pelo apoio. Obrigada por ser você, tão querido, que conquista a todos em sua volta.

A todos os colegas de laboratório: Juan, Dani, Lídia, Victor, Eduardo, Danylo, Daniel. Obrigada! Pelas discussões de trabalho, pelos almoços (e bolos no SP!). Obrigada por me acolherem e terem paciência comigo (ainda mais quando não entendo absolutamente nada de jogos hahahaha). Vocês são pessoas incríveis que tenho em meu coração e levarei comigo onde for. Saiba que podem contar comigo para o que precisar.

As secretárias do Programa de Pós-Graduação Interunidades em Biotecnologia, Fábria e Eliane, pela paciência e por sempre ajudarem no que podem. Obrigada por sempre estarem prontas para as dúvidas (e desespero), por nos ajudarem a compreender melhor os trâmites da pós-graduação.

Ao Alexandre K. Tashima e sua aluna Tássia Chiarelli pela disponibilidade nas análises de espectrometria de massas. Ao Benedito Prezotto, pela disponibilidade e auxílio na análise de tromboelastometria.

Ao Bryan Grieg Fry, por me aceitar e proporcionar uma das melhores experiências da minha vida. Estar na Austrália no meio de uma pandemia, correndo contra o tempo e tentando aprender o máximo possível, mesmo com todas as dificuldades, foi um grande desafio. Seu incentivo e grandes ideias foram essenciais para esse período ser tão proveitoso.

Não posso também deixar de agradecer toda a sua equipe (Lachlan, Rocky, Lorenzo, James, Nick, Richard) por me acolherem, me fazerem sentir parte daquele contexto, ensinar-me as técnicas e por ajudarem a melhorar meu inglês. Agradeço muito pelos ensinamentos, risadas, músicas e passeios que vocês me levaram. Cada um com sua personalidade, me fizeram rir, aprender, me desenvolver.

Agradeço principalmente a Christina, lab manager, por me guiar, me compreender, intermediar conversas e me ensinar diversas técnicas. Vocês me ensinaram que o equilíbrio entre trabalho e vida pessoal nos deixa ainda mais produtivos. E que esse período intenso, além de trazer frutos profissionais, também trouxe relações de amizade.

Agradeço também meus amigos Unespianos que encontrei na Austrália, Mayara e Marcelo. Vocês deixaram tudo mais leve, me deram força e me trouxeram um sentimento de casa mesmo do outro lado do mundo. Os cafés, almoços e fins de semana com vocês eram um

momento muito familiar num contexto tão diferente. Agradeço também meus roommates (Emma, Julia, Rafael e MinJing), que mesmo sendo de culturas tão distantes foram extremamente gentis e acolhedores. Obrigada pelas conversas e por me fazerem me sentir em um lar na Austrália.

O doutorado foi uma jornada incrível, de desenvolvimento profissional, pessoal, onde encarei de peito aberto diversas experiências – e aprendi demais. Sou muito grata por tudo o que vivi – e por ter tanta gente boa caminhando junto comigo. Apesar de jogar sempre no “hard”, tudo é mais bonito quando temos pessoas compartilhando ao nosso lado.

Por isso, obrigada!

## **AGRADECIMENTOS**

Esta tese não seria concluída sem o apoio do Programa de Pós-graduação Interunidades em Biotecnologia.

Agradeço o apoio financeiro da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), processo n° 1689945 (Bolsa no país).

Agradeço novamente à CAPES pela possibilidade de realização de um período na Universidade de Queensland (Austrália) pelo programa PrInt PDSE, processo n° 88887.465664/2019-00 (Programa PrInt-PDSE).

## RESUMO

RODRIGUES, C.F.B. **Identificação, isolamento e caracterização do inibidor de PLA<sub>2</sub> presente no soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor***. 2021. 118 folhas. Tese (Doutorado em Biotecnologia). – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

O plasma de uma série de animais possui componentes que promovem uma resistência natural ao envenenamento, através da inibição de proteínas específicas que compõem o veneno das serpentes, como as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s). A hipótese mais consistente para a presença de tais inibidores seria a proteção contra o auto envenenamento. Porém, a ocorrência de inibidores no plasma de serpentes não peçonhentas, bem como em outras espécies de animais, abriu novas perspectivas em relação à presença de tais moléculas. Deste modo, o presente trabalho tem como objetivo a identificação, o isolamento e a caracterização de um inibidor de PLA<sub>2</sub> (PLI) presente no soro da *Boa constrictor* (BoaγPLI), serpente não peçonhenta que habita extensamente o território brasileiro. Para tal, o inibidor foi isolado do soro de *B. constrictor* através de dois passos cromatográficos, tendo 0,63% de recuperação. A partir de então, foi realizada sua caracterização estrutural por SDS-PAGE, sendo identificada uma banda principal a 25 kDa, em condições redutoras, e 20 kDa, em condições não redutoras. Sua estrutura primária parcial foi identificada, possuindo alta homologia com outros PLI<sub>γ</sub>s, como o de *Lachesis muta*. Sua estrutura secundária também é semelhante a outros PLI<sub>γ</sub>s. Além disso, quando incubado com a Asp-49 e Lys-49 PLA<sub>2</sub>s, em análise por dicroísmo circular, observou-se que não houve alteração severa de seu espectro. As análises cromatográficas de exclusão molecular (SEC) corroboraram a hipótese de formação de oligômeros do inibidor isolado. Para investigar o tipo de interação entre o PLI e PLA<sub>2</sub>s, uma varredura de fluorescência foi realizada, mostrando uma diminuição no pico da fluorescência quando incubadas. A interação entre inibidor e PLA<sub>2</sub> também foi evidenciada por *western blotting*. Uma vez a interação confirmada, foi realizado o ensaio de inibição enzimática com a Asp-49 PLA<sub>2</sub>, uma vez que a substituição no resíduo 49 (Lys-49 PLA<sub>2</sub>) leva a perda de atividade enzimática. O BoaγPLI apresentou inibição de caráter dose-dependente, chegando a ~48% de inibição. Seu potencial inibitório também foi certificado por ensaios farmacológicos de edema e miotoxicidade. Não houve diferença entre o potencial inibitório com as duas isoformas de PLA<sub>2</sub>s testadas. Para averiguar o envolvimento do inibidor com tal atividade, foi realizado o ensaio de tromboelastometria, no qual o tempo de coagulação foi diminuído quando a crotoxina foi incubada com o inibidor. Ademais, para investigação do

potencial inibitório do Bo $\alpha$ PLI em relação ao veneno total de uma serpente ofiófaga, foi testada a sua ação inibitória da atividade anticoagulante do veneno de *Micrurus laticollaris*. O Bo $\alpha$ PLI foi eficaz na inibição da atividade anticoagulante, evidenciado pelo retorno em tempo de coagulação e da força do coágulo comparado ao controle. Deste modo, o presente estudo pode contribuir introduzindo novas perspectivas para inibidores de PLA<sub>2</sub> provenientes de plasma de serpentes não peçonhentas.

**Palavras chaves:** Fosfolipase A<sub>2</sub>; Envenenamento; Inibidor endógeno de veneno; Serpente não peçonhenta.

## ABSTRACT

RODRIGUES, C.F.B. **Identification, isolation and characterization of the PLA<sub>2</sub> plasma inhibitor from the non-venomous snake *Boa constrictor* serum.** 2021. 118 pages. Ph.D. Thesis (Ph.D. Thesis in Biotechnology). – Instituto de Ciências Biomédicas, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2021.

Plasma in several organisms has components that promote a natural resistance to envenomation by inhibiting specific proteins that constitute snake venoms, such as phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s). The most consistent hypothesis for the presence of such inhibitors would be protection against self-envenomation in venomous snakes, but the occurrence of inhibitors in the plasma of non-venomous snakes, as well as in other species of animals, has opened new perspectives for the presence of these molecules. Thus, the work aimed to identify, isolate, and characterize a PLA<sub>2</sub> inhibitor (PLI) present in the serum of *Boa constrictor*, a non-venomous snake that dwells extensively in the Brazilian territory. For such purpose, the inhibitor was isolated from *B. constrictor* serum by two chromatographic steps, with 0.63% of recovery. From this point on, the structural characterization was performed by SDS-PAGE, which showed a major band at 25 kDa under reducing conditions and 20 kDa under non-reducing conditions. Its partial primary structure was identified, possessing high homology with other PLIys, such as *Lachesis muta*. Its secondary structure is also similar to other PLIys. In addition, when incubated with Asp-49 and Lys-49 PLA<sub>2</sub>s, analyzed by circular dichroism, showed that there was no severe change in its spectrum. The chromatographic analysis of molecular exclusion corroborated the presence of oligomers in the isolated inhibitor. To investigate the interaction between the PLI and the PLA<sub>2</sub>, a fluorescence scan was performed, showing a decrease in the fluorescence peak when incubated. The interaction between inhibitor and PLA<sub>2</sub> was also confirmed by western blotting. Once the interaction was established, an enzymatic inhibition assay was performed only with Asp-49 PLA<sub>2</sub>, since the substitution on the 49 residue (Lys-49) leads to loss of enzymatic activity. The BoaγPLI showed a dose-dependent inhibition, reaching at ~48% when the inhibitor was incubated with PLA<sub>2</sub>. Its inhibitory potential was also confirmed by pharmacological tests of edema and myotoxicity. There was no difference between the inhibitory potential with the two isoforms of PLA<sub>2</sub>s tested. To investigate the involvement of the inhibitor with such activity, a thromboelastometric assay was performed in which the coagulation time was decreased when the crotoxin was incubated with the inhibitor. Furthermore, to investigate the inhibitory potential of BoaγPLI in relation to the whole venom



of an ophiophage snake, the inhibitory action of the anticoagulant activity of the venom of *Micrurus laticollaris*, ophiophage snake and sympatric to *B. constrictor* was also investigated, whereas the Bo $\alpha$ PLI was efficient on returning the clotting time and strength. Thus, the present work may provide new insights into protein inhibitors acting on envenomation in non-venomous snakes.

**Keywords:** Phospholipases A<sub>2</sub>; Envenomation; Endogenous venom inhibitor; Non-venomous snakes.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 2.1** A) Fracionamento do soro de *Boa constrictor*. Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap DEAE 5 mL com tampão A (Tris 25 mM pH 7,5) e tampão B (Tris 25 mM NaCl 1 M, pH 7,5), fluxo de 1 mL/min. Cinco mL de soro diluído em tampão A foram aplicados na cromatografia, que teve início a 5% de B, seguidos por um step a 10% de B e então um gradiente de 10% a 50% de B. Foram evidenciadas três frações resultantes: D0, D1 e D2. B) Eluição da fração D2 em cromatografia de afinidade com crotoxina acoplada em resina CNBr-activated Sepharose (GE Healthcare). A eluição foi realizada com glicina 0,1 M, pH 2,7, o pH neutralizado com a adição de Tris 1 M pH 8.8. A eluição foi dosada manualmente a 280 nm. .... 57

**Figure 2.2** Alinhamento da sequência parcial do PLI de *Boa constrictor* (Boa $\gamma$ PLI) com o inibidor BcNF, identificado por transcriptoma no fígado da serpente *Boa constrictor*. A cor azul representa aminoácidos hidrofóbicos, vermelho os que possuem carga positiva, magenta: carga negativa, verde: aminoácidos polares, rosa claro: cisteínas, laranja: glicinas, amarelo: prolinas, azul turquesa: aminoácidos aromáticos, sequências não conservadas ou que não foram identificadas no massas não estão coloridas. Padrão de cor Clustal Ômega. .... 59

**Figura 2.3** Espectro de MS / MS anotado do peptídeo tríptico “EPCEDQPFPLSLR” do Boa $\gamma$ PLI. O peptídeo foi detectado em m/z 871.42<sup>+2</sup>e identificado pela pesquisa no banco de dados PEAKS Studio 7.5. .... 60

**Figura 2.4** Espectros obtidos por dicroísmo circular em comprimentos de onda entre 190 e 260 nm. Os dados foram expressos em Elipcidade Molar. A partir de seu espectro, foi possível estimar o teor da estrutura secundária das proteínas em questão. A) Boa $\gamma$ PLI e Asp-49 PLA<sub>2</sub> isolados e incubados (30  $\mu$ g) B) Boa $\gamma$ PLI e Lys-49 PLA<sub>2</sub> isolados e incubados (30  $\mu$ g). .... 61

**Figura 2.5** Cromatografia de exclusão molecular em coluna BioSep SEC 2000 do inibidor Boa $\gamma$ PLI (20  $\mu$ g). A corrida foi realizada com Tris HCl 0.05 M, NaCl 0,05 M, pH 8, com fluxo de 1 mL / min e detecção em 280 nm. .... 62

**Figure 2.6** Espectro de emissão de fluorescência entre os comprimentos de onda 300 nm a 400 nm com excitação a 280 nm de A) Asp-49 PLA<sub>2</sub> e B) Lys-49 PLA<sub>2</sub> isoladas, Boa $\gamma$ PLI isolado e incubados (30  $\mu$ g). Os dados foram expressos em porcentagem relativa, com o valor máximo do tratamento Boa $\gamma$ PLI como 100%. Todos os valores foram subtraídos do espectro do branco (NaCl 0,9%). .... 63

**Figura 2.7** Imunorreconhecimento do soro inicial de *Boa constrictor* e Boa $\gamma$ PLI, sob condições redutoras. As proteínas (20 $\mu$ g) foram submetidas a SDS-PAGE 12% e transferidas à membrana de PVDF, que foi incubada com PLA<sub>2</sub> de *C. d. terrificus* (2  $\mu$ g) e, posteriormente, soro anticrotálico como anticorpo primário e IgG de cavalo conjugado com peroxidase como anticorpo secundário. A revelação foi realizada com DAB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 1. Marcador de massa molecular; 2. Soro de *Boa constrictor*; 3. Boa $\gamma$ PLI. .... 64

**Figura 2.8** Inibição da atividade enzimática da PLA<sub>2</sub> de *C. d. terrificus* por diferentes concentrações de Boa $\gamma$ PLI com o substrato sintético NOB. Monitoramento a 405 nm, por 90 minutos, com intervalos de leitura de 5 minutos. Os dados foram expressos como porcentagem

relativa (%) em relação ao controle positivo (Asp-49 PLA<sub>2</sub>) do último ponto de leitura (90 minutos). \* representa valores significativamente diferentes em relação à PLA<sub>2</sub> (ANOVA com Tukey como teste *a posteriori*, p<0,05). ..... 65

**Figura 2.9** Atividade edematogênica de Asp-49 (A) e Lys-49 PLA<sub>2</sub> (B) isoladas e quando incubadas previamente por 30 min com 20 µg de BoαPLI, injetadas na região sub plantar direita da pata de camundongo (Swiss). \* representa valores significativamente diferentes em relação à PLA<sub>2</sub> (ANOVA de duas vias com Tukey como teste *a posteriori*, p<0,05). ..... 67

**Figura 2.10** Atividade miotóxica de Asp-49 e Lys-49 PLA<sub>2</sub>s isoladas e quando incubadas previamente por 30 min com 20 µg de BoαPLI, injetadas no músculo gastrocnêmio de camundongos (Swis). \* representa diferenças estatísticas quando comparado às PLA<sub>2</sub>s. ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori*. ..... 68

**Figura 2.11** Tempo de coagulação (TC) da tromboplastina parcial ativada de plasma de galinha quando ativado com ácido elágico (**Controle**), incubado com 500 ng de BoαPLI (**BoαPLI**), com 100 ng de Crotoxina (**Ctx**) e incubado com BoαPLI (500 ng) e Crotoxina (100 ng) (**BoαPLI + Ctx**). N= 4, ANOVA com Tukey como teste *a posteriori*. \* representa valores significativamente diferentes em relação à crotoxina (p<0,05). ..... 69

**Figura 2.12** Perfil tromboelastométrico de tromboplastina parcial ativada (TTPa) por ácido elágico (A), quando ativada e incubada com o inibidor BoαPLI (500 ng) (B), incubada com inibidor BoαPLI (500 ng) e crotoxina (100 ng) (C) e incubada com a crotoxina (100 ng) (D). Eixo X = Tempo (segundos); eixo Y = Amplitude (milímetros). ..... 70

**Figura 3.1** Tempos de coagulação (segundos) do veneno de *M. laticollaris* isolado (vermelho) ou incubado com BoαPLI (azul) em diferentes proporções (1: 2; 1: 5; 1:10). O FXa foi usado como um ativador de coagulação (consulte a seção 3.4.1 para obter detalhes). O inibidor reduziu o tempo de coagulação quando incubado com o veneno. (\*) representa significância estatística (ANOVA de uma via com Sidak como um teste *a posteriori*, p <0,05 foi considerado significativo. Cada barra é a média de n = 3 com barras de erro representadas pelo desvio padrão. .... 85

**Figura 3.2** Traços tromboelastográficos comparando o controle negativo (cinza), BoαPLI (verde), veneno de *M. laticollaris* (vermelho) e *M. laticollaris* incubado com BoαPLI (azul). Cada traço representa uma réplica. Três repetições foram executadas por tratamento. É possível observar a ausência de coagulação (linha reta vermelha) com o veneno, e a coagulação restaurada quando o veneno foi pré-incubado com o BoαPLI (C e D). ..... 86

**Figura 3.3** Parâmetros tromboelastográficos do veneno de *M. laticollaris* (Vermelho), *M. laticollaris* com BoαPLI incubada (azul), BoαPLI (verde) e Controle Negativo (cinza). Os parâmetros avaliam a velocidade de coagulação (SP - ponto de divisão (segundos), R - tempo até o coágulo detectável - 2 mm (segundos), TMTRGG - tempo até a taxa máxima de geração de trombo (minutos)), e a força do coágulo (MA - amplitude máxima do coágulo (milímetros), MRTGG - taxa máxima de geração de trombo (dynes / cm<sup>2</sup> / s), TGG - trombo total gerado (dynes / cm<sup>2</sup>)). Cada experimento foi realizado em triplicata e os valores foram apresentados como média ± desvio padrão. Símbolos diferentes representam significância estatística (ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori*). Valores de p <0,05 foram considerados significativos. .... 87

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 2.1</b> Tabela de purificação do PLI de <i>Boa constrictor</i> .....	58
<b>Tabela 2.2</b> Proteínas identificadas com maior porcentagem da cobertura a partir dos peptídeos obtidos da banda retirada do SDS-PAGE (Figura 2.1, inserto) e analisadas por espectrometria de massas. ....	59
<b>Tabela 2.3</b> Porcentagens aproximadas de estruturas secundárias do inibidor isolado (Boa $\gamma$ PLI), Asp-49 / Lys-49 PLA <sub>2</sub> e Boa $\gamma$ PLI isolados e incubados calculadas a partir do espectro de dicroísmo circular. ....	61
<b>Table 3.1</b> Parâmetros tromboelastográficos do veneno de <i>M. laticollaris</i> , <i>M. laticollaris</i> incubado com Boa $\gamma$ PLI, Boa $\gamma$ PLI e controle negativo). Os parâmetros avaliam a velocidade de coagulação (SP – split point (segundos), R - tempo até o coágulo detectável - 2 mm (segundos), TMTRGG - tempo até a taxa máxima de geração de trombo (minutos)), e a força do coágulo (MA - amplitude máxima do coágulo (milímetros), MRTGG - taxa máxima de geração de trombo (dynes / cm <sup>2</sup> / s), TGG - trombo total gerado (dynes / cm <sup>2</sup> ))......	88

## LISTA DE ABREVIATURAS

°C – graus Celsius

µg – microgramas

µL – microlitro

ADH – álcool desidrogenase

ANOVA – análise de variância

antiIgG – anti imunoglobulina do tipo G

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

AUC – área sob a curva

CaCl<sub>2</sub> – cloreto de cálcio

CD – dicroísmo circular

CDNN – *Circular Dichroism analysis using Neural Networks*

CEUA – Comitê de ética no uso de animais

CFPb – glufibrinopeptídeo

CK – creatina quinase

cm<sup>2</sup> – centímetro quadrado

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

CoCl<sub>2</sub> – Cloreto de cobalto

COX – ciclo-oxigenases

cPLA<sub>2</sub> – PLA<sub>2</sub> citossólica

CRD – domínio de reconhecimento de carboidrato

CTLD – Domínios de lectina do tipo C

Ctx – crotoxina

DAB – 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloro

ddH<sub>2</sub>O – água duplamente deionizada

DEAE – dietilaminoetil

DTT – Ditionitrosol

dynes – unidade de força equivalente a g·cm/s<sup>2</sup>

EPI – Equipamento de proteção individual

eV – eletrônvolt

F – F ratio, força da ANOVA

FX – Fator X

FXa – Fator X ativado

g – força g

H<sub>2</sub>O – água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – peróxido de hidrogênio

HCl – ácido clorídrico

HDMS<sup>E</sup> – mobilidade iônica e análise independente de dados como forma de aquisição de MS

hrs – horas

IAA – iodoacetamida

iPLA<sub>2</sub> – PLA<sub>2</sub> independente de cálcio

KCl – cloreto de potássio

kDA – quilo daltons

$\text{KH}_2\text{PO}_4$  – Potássio fosfato monobásico

LAAO – L-aminoácido oxidase

LOX – lipo-oxigenases

LPLA<sub>2</sub> – PLA<sub>2</sub> lipossomal

LRRs – *leucine rich repeat*

Lys-49 – resíduo de aminoácido lisina na posição 49

M – molar

m/z – razão massa sobre carga

MA – amplitude máxima

mg – miligramas

min – minutos

mL – mililitros

mm – milímetros

mM – milimolar

MPI – *Myotoxin plasma inhibitor*

MRTGG – taxa máxima de geração de trombo

MS/MS – espectrometria de massas *in tandem*

$\text{Na}_2\text{HPO}_4$  – Fosfato de sódio dibásico

NaCl – cloreto de sódio

NanoESI-qTOF – nano *eletrospray* – quadrupolo – tempo de voo

ng – nanogramas

nL – nanolitros

nm – nanômetros

Nmol /L – nanomol / litro

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

$\epsilon$  – elipcidade molar

OK – tampão Owren-Koller

OMS – Organização Mundial de Saúde

p – grau de significância estatística

PBS – Tampão fosfato salino

PDA – arranjo de diodo

pH – Potencial hidrogeniônico

PLA<sub>2</sub> – Fosfolipase A<sub>2</sub>

PLI – *Fosfolipase A<sub>2</sub> plasma inhibitor*

PVDF – Difluoreto de polivinilideno

R – tempo até um coágulo detectável (2 mm)

s – segundos

SDS-PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS

SEC – *size exclusion chromatography*

SINAN – Sistema de informação de agravos de notificações



SP – *split point* – tempo de formação do coágulo

sPLA<sub>2</sub> – PLA<sub>2</sub> secretória

SVMP – Metaloprotease

SVSV – Serinoprotease

TC – tempo de coagulação

TFA – ácido trifluoroacético

TGG – trombo total gerado

TMRTGG – tempo até a taxa máxima de geração do trombo

TOF – tempo de voo

TRIS – tris(hidroximetil)aminometano

TTPa – tempo de tromboplastina parcial ativada

UPLC – cromatografia de ultra eficiência

UV-VIS – ultravioleta/luz visível

V – volts

v/v – volume/volume

$\lambda_{\text{máx}}$  – comprimento de onda máximo

## SUMÁRIO

<b>CAPÍTULO 1</b> .....	<b>29</b>
<b>1.1 INTRODUÇÃO GERAL</b> .....	<b>29</b>
1.1.1 Envenenamento .....	29
1.1.2 Fosfolipases A <sub>2</sub> s (PLA <sub>2</sub> s).....	32
1.1.3 Inibidores em plasma de serpentes (PLIs) .....	35
1.1.3.1 Inibidores Classe $\alpha$ .....	39
1.1.3.2 Inibidores Classe $\beta$ .....	40
1.1.3.3 Inibidores Classe $\gamma$ .....	41
1.1.4 <i>Boa constrictor</i> .....	42
<b>CAPÍTULO 2</b> .....	<b>44</b>
<b>2.1 INTRODUÇÃO</b> .....	<b>45</b>
<b>2.2 OBJETIVOS</b> .....	<b>47</b>
2.2.1 Objetivos gerais.....	47
2.2.2 Objetivos específicos.....	47
<b>2.3 MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	<b>48</b>
2.3.1 Comitê de Ética .....	48
2.3.2 Venenos .....	48
2.3.3 Soro .....	48
2.3.4 Purificação da Asp-49 PLA <sub>2</sub> de <i>Crotalus durissus terrificus</i> e Lys-49 PLA <sub>2</sub> de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	48
2.3.5 Purificação do PLI.....	49
2.3.5.1 Cromatografia de troca iônica .....	49
2.3.5.2 Cromatografia de afinidade .....	49
2.3.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE).....	50
2.3.6 Espectrometria de massas (nanoESI-qTOF).....	50
2.3.6.1 Digestão das bandas de SDS-PAGE para identificação do inibidor.....	50
2.3.6.2 Análises das amostras digeridas por espectrometria de massas - “Data Independent Acquisition” .....	50
2.3.6.3 Identificação de proteínas por busca em banco de dados .....	51
2.3.7 Dicroísmo circular .....	51
2.3.8 Análises cromatográficas de interações do inibidor com a PLA <sub>2</sub> .....	52
2.3.9 Ensaio de Emissão de Fluorescência.....	52

2.3.10 Western Blotting.....	52
2.3.11 Caracterização enzimática da PLA <sub>2</sub> e Neutralização.....	53
2.3.12 Ensaio farmacológicos .....	53
2.3.12.1 Animais .....	53
2.3.12.2 Avaliação do edema de pata.....	54
2.3.12.3 Atividade miotóxica.....	54
2.3.13 Tromboelastometria .....	54
2.3.13.1 Obtenção de plasma citrado de galinha.....	54
2.3.13.2 Teste de coagulação .....	55
2.3.14 Análises estatísticas.....	55
<b>2.4 RESULTADOS .....</b>	<b>56</b>
2.4.1 Purificação.....	56
2.4.2 Caracterização estrutural .....	57
2.4.2.1 Caracterização da estrutura primária - SDS-PAGE.....	57
2.4.2.2 Caracterização da estrutura primária – Espectrometria de massas .....	57
2.4.2.3 Dicroísmo circular .....	59
2.4.2.4 Oligomerização – Cromatografia de exclusão molecular .....	60
2.4.3 Caracterização interação com as PLA <sub>2</sub> s .....	61
2.4.3.1 DSF – análise de fluorescência de varredura.....	61
2.4.3.2 Imunorreconhecimento – Western blotting .....	62
2.4.4 Caracterização funcional.....	63
2.4.4.1 Ensaio enzimático.....	63
2.4.4.2 Ensaio farmacológicos.....	64
2.4.4.2.1 Edema de pata e miotoxicidade .....	64
2.4.4.3 Inibição da atividade anticoagulante .....	67
<b>2.5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>70</b>
<b>CAPÍTULO 3 .....</b>	<b>76</b>
<b>3.1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>77</b>
<b>3.2 OBJETIVOS .....</b>	<b>80</b>
3.2.1 Objetivos gerais.....	80
3.2.2 Objetivos específicos.....	80
<b>3.3 MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>81</b>
3.3.1 Veneno e Inibidor – obtenção e preparação.....	81
3.3.2 Preparação do plasma .....	81
3.3.3 Ensaio de coagulação.....	81

3.3.4 Tromboelastografia (TEG).....	82
3.3.5 Análises estatísticas.....	82
<b>3.4 RESULTADOS .....</b>	<b>83</b>
3.4.1 Ensaio de coagulação (Stago STA-R MAX analyser).....	83
3.4.2 Tromboelastografia (TEG).....	84
<b>3.5 DISCUSSÃO .....</b>	<b>88</b>
<b>CAPÍTULO 4 .....</b>	<b>91</b>
<b>4.1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS .....</b>	<b>91</b>
<b>REFERÊNCIAS* .....</b>	<b>94</b>
<b>ANEXO 1 .....</b>	<b>116</b>
<b>ANEXO 2 .....</b>	<b>118</b>

# CAPÍTULO 1

## 1.1 INTRODUÇÃO GERAL

### 1.1.1 Envenenamento

O envenenamento ofídico foi reclassificado como uma doença tropical negligenciada pela Organização Mundial de Saúde (OMS), cuja classificação havia sido excluída em 2013. Tal fato auxilia na elaboração de políticas públicas que reduzam os danos decorrentes dos acidentes relacionados com serpentes (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; WILLIAMS et al., 2010; CHIPPAUX, 2017). Tais acidentes ocorrem sobretudo em países em desenvolvimento, localizados em regiões tropicais e subtropicais (KASTURIRATNE et al., 2008; ADUKAUSKIENÉ; VARANAUSKIENÉ; ADUKAUSKAITÉ, 2011).

O grande número de casos de envenenamento por serpentes em países em desenvolvimento em regiões tropicais ocorre devido a uma série de fatores, como densidade populacional, alto número de serpentes, dificuldade de acesso a equipamentos de proteção individual (EPIs) apropriados e base econômica voltada à agricultura (HARRISON et al., 2009; FRY, 2018).

Deste modo, o acidente por serpentes peçonhentas é considerado uma doença ocupacional, agravado pela precariedade do acesso à terapia antiveneno (WARRELL, 2010; CHIPPAUX, 2017). O Brasil possui um grande número de acidentes ofídicos, sobretudo em áreas rurais, uma vez que a economia é baseada em agricultura (MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2015). Ademais, apesar do Brasil possuir um bom sistema de notificações de envenenamentos através do SINAN (Sistema de Informação de Agravos de Notificação) (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2013), a subnotificação ainda é proeminente, uma vez que há populações remotas, que abrangem sobretudo a região Norte, onde por possuírem difícil acesso aos sistemas de vigilância, está entre as regiões com maior índice de subnotificação (FAN; MONTEIRO, 2018).

O veneno é uma ferramenta relacionada à imobilização, morte e digestão de presas, defesa contra predadores, e, de forma secundária, pode acometer humanos, resultando em graves consequências fisiológicas (KANG et al., 2011). Tais ações farmacológicas estão

relacionadas às toxinas presentes no veneno, que consistem majoritariamente em proteínas, cujas atividades promovem desbalanços homeostáticos, neuromotores, inflamatórios e transtornos da coagulação sanguínea (GUTIÉRREZ et al., 2009a; CALVETE, 2017).

Dentre as proteínas enzimáticas encontradas comumente nos venenos estão metaloproteases (SVMPs), serinoproteases (SVSPs), **fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s)** e L-aminoácido oxidases (LAAOs) (LOMONTE; CALVETE, 2017). Apesar da composição do veneno de serpentes estar restrita a um número reduzido de famílias de proteínas, em um único veneno podem ocorrer inúmeras isoformas. Ademais, efeitos sinérgicos entre as toxinas e diferentes efeitos fisiopatológicos ocasionados por tais componentes são frequentes (CALVETE et al., 2009; KANG et al., 2011; SANTOS BARRETO et al., 2017).

No Brasil, existem duas famílias de serpentes peçonhentas (Elapidae e Viperidae), sendo que a família Viperidae é responsável pela maior letalidade nos acidentes ofídicos (CHIPPAUX, 2015). O envenenamento ocasionado por serpentes da família Elapidae, em geral, são considerados neurotóxicos, apesar de efeitos na coagulação e rbdomiólise também serem descritos (LOMONTE et al., 2016; GUTIÉRREZ et al., 2017; KOH; BENDRE; KINI, 2020).

O envenenamento causado por serpentes da família Viperidae, por sua vez, é considerado hemotóxico e miotóxico (ADUKAUSKIENÉ; VARANAUSKIENÉ; ADUKAUSKAITÉ, 2011), sendo caracterizado por um dano tecidual severo, abrangendo inchaço, bolhas, hemorragia e necrose muscular, relacionado, sobretudo, à presença de proteínas como as SVMPs e PLA<sub>2</sub>s. Tais efeitos se desenvolvem rapidamente, principalmente com a dificuldade no acesso ao tratamento imediato, podendo trazer danos irreversíveis. (PICOLO et al., 2002; GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015).

Os efeitos locais estão geralmente relacionados com transtornos inflamatórios que levam a efeitos como dor, edema e miotoxicidade (TEIXEIRA et al., 2019). Geralmente, mediadores inflamatórios, ativados pelas ações farmacológicas de toxinas, possuem papel proeminente na formação e manutenção dos efeitos locais (GUTIÉRREZ et al., 2009a). Além dos danos locais, efeitos sistêmicos como hemorragia, hipovolemia, efeitos no miocárdio, insuficiência renal e síndrome respiratória também figuram entre as consequências do envenenamento por serpentes (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006). Assim como

os danos teciduais locais, os efeitos sistêmicos ligados aos transtornos da coagulação também estão relacionado às ações das SVMPs e PLA<sub>2</sub>s (KINI et al., 2011).

O envenenamento por serpentes pode apresentar ações procoagulantes e/ou anticoagulantes (KINI; RAO; JOSEPH, 2001; KINI, 2006; KINI et al., 2011; FRY, 2015). As ações procoagulantes estão relacionadas com a ativação direta de fatores da coagulação como Fator X (FX) (KINI; RAO; JOSEPH, 2001; KINI, 2005a; FRY, 2015; OULION et al., 2018; ZDENEK et al., 2019). Por outro lado, as ações anticoagulantes podem ser ocasionadas pela inibição de fatores de coagulação (KINI, 2006; YOUNGMAN et al., 2019), clivagem destrutiva de fibrinogênio (BITTENBINDER et al., 2019), ou consumo do fibrinogênio em uma ação pseudoprocoagulante (DEBONO et al., 2019; BOURKE et al., 2020), através da clivagem anormal do fibrinogênio, formando coágulos frágeis (KINI; RAO; JOSEPH, 2001; DEBONO et al., 2019; BOURKE et al., 2020).

O único tratamento eficaz contra o envenenamento por serpentes é a soroterapia, que consiste em anticorpos obtidos através da administração, em doses subletais, de veneno em animais de grande porte, como por exemplo, cavalos (ALIROL et al., 2015). Tal soro pode ser polivalente, isto é, obtido através de uma mistura de venenos de várias espécies de serpentes, ou monovalente, obtido através de veneno de uma única espécie.

A variação composicional dos venenos pode afetar a eficácia do soro (GUTIÉRREZ et al., 2009b). Além disso, a soroterapia não é totalmente eficaz na reparação dos danos teciduais ou locais, e depende do intervalo entre o acidente e a administração do soro, e da quantidade utilizada (PICOLO et al., 2002). Outro problema proeminente são os efeitos adversos que a administração de anticorpos exógenos pode ocasionar (PRABHAKAR; MOTIRAM; GHANSHYAM, 2014).

Tais fatores, juntamente com a dificuldade de acesso à soroterapia em regiões remotas (FAN; MONTEIRO, 2018), incentivam a busca de adjuvantes à terapia tradicional para reduzir a quantidade de anticorpos utilizados, além de protelar os efeitos fisiopatológicos do envenenamento, assegurando um maior período para o recebimento da terapia antiveneno tradicional (LEWIN et al., 2016; SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017; ALBULESCU et al., 2019). Diversos inibidores naturais foram identificados para combater o envenenamento com base na inibição das proteínas que os compõem, mitigando assim seu efeito biológico (SAM Y

et al., 2012; SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015; XIAO et al., 2017). Além disso, drogas reposicionadas estão sendo uma estratégia explorada para a utilização como adjuvantes à terapia antiveneno, por sua fácil administração e amplo espectro de inibição (LEWIN et al., 2016; YOUNGMAN et al., 2020).

### 1.1.2 Fosfolipases A<sub>2</sub>s (PLA<sub>2</sub>s)

As PLA<sub>2</sub>s correspondem a uma superfamília, sendo classificada de acordo com sua homologia e conformação de sua estrutura terciária em 16 famílias. Além disso, também podem ser divididas em seis classes, de acordo com a similaridade bioquímica e regulação celular, sendo essas: PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>s), PLA<sub>2</sub> independente de cálcio (iPLA<sub>2</sub>s), PLA<sub>2</sub> secretoras (sPLA<sub>2</sub>s), PLA<sub>2</sub>s lisossomais (LPLA<sub>2</sub>s), entre outros (DENNIS et al., 2011; MURAKAMI, 2019)

As fosfolipases A<sub>2</sub> secretoras (sPLA<sub>2</sub>s) correspondem a uma superfamília de PLA<sub>2</sub>s, possuindo a tríade enzimática e a Histidina 48 como elemento chave para a atividade enzimática, um domínio de ligação do cálcio e sete pontes dissulfeto conservadas. Além disso, há grande semelhança estrutural entre o sítio catalítico das PLA<sub>2</sub>s secretórias (MURAKAMI; TAKETOMI, 2015). Apesar do mecanismo de catálise e da estrutura terciária das PLA<sub>2</sub>s serem extremamente conservadas, seu mecanismo de ação é diverso, tendo inúmeros efeitos fisiopatológicos (KINI, 2005b).

As PLA<sub>2</sub>s possuem baixa massa molecular (13-15 kDa), sendo compostas por uma  $\alpha$ -hélice amino terminal anfipática (resíduos 2-13), um “loop” para ligação com Ca<sup>2+</sup>, duas  $\alpha$ -hélices antiparalelas (hélice 2 e 3) (resíduo 40-53 e 90-108), duas formações em folhas- $\beta$  antiparalelas que formam uma estrutura denominada de “asa- $\beta$ ” (resíduo 75-84), um “loop” extenso C-terminal (resíduos 109-133) e 7 ligações dissulfeto, podendo haver uma ou duas variações que auxiliam na estabilidade da enzima (RIGDEN et al., 2003). Esta estrutura corresponde à maioria das PLA<sub>2</sub>s, incluindo as humanas, sendo amplamente distribuídas nos organismos, tendo como função a catálise da hidrólise de substratos específicos, geralmente fosfolipídios (MURAKAMI; TAKETOMI, 2015).



A atividade enzimática das PLA<sub>2</sub>s sobre a bicamada lipídica resulta na geração de dois produtos, os **lisofosfolipídios**, que atuam como mensageiros secundários e podem ser posteriormente catalisados por fatores ativadores de plaquetas; o **ácido araquidônico**, por sua vez, é substrato para duas vias enzimáticas: a via das ciclo-oxigenases (COX), a qual produz prostaglandinas, tromboxanos e prostaciclina e a segunda via catalisada por lipoxigenases (LOX), que gera leucotrienos e lipoxinas, esses produtos atuam como mediadores pró-inflamatórios (MURAKAMI et al., 2014). Porém, dependendo da isoforma, essas enzimas podem hidrolisar uma vasta gama de substratos (MURAKAMI; TAKETOMI, 2015).

A hidrólise ocorre na posição sn-2 do glicerol na interface lipídio/água, pois as enzimas atuam preferencialmente em substratos agregados em micelas, bicamadas ou lipoproteínas. *In vivo*, a posição sn-2 dos fosfolipídios frequentemente contém ácidos graxos poli-insaturados, que, quando liberados, podem ser metabolizados em moléculas de eicosanoides (BURKE; DENNIS, 2009).

Como mencionado anteriormente, as PLA<sub>2</sub>s possuem vasta distribuição em diversos organismos, incluindo mamíferos, podendo ser tóxicas ou não. Em mamíferos, é uma enzima não tóxica, possuindo ações fisiológicas importantes e estão relacionadas, quando super expressas, com patologias como reumatismo, asma, entre outras desordens relativas ao processo inflamatório (BURKE; DENNIS, 2009; DENNIS et al., 2011; DAN; ROSENBLAT; YEDGAR, 2012). Em contraste, PLA<sub>2</sub> de venenos são classificadas como toxinas, sendo uma das principais famílias de proteínas envolvidas na imobilização e na captura de presas. Ademais, a estrutura catalítica das PLA<sub>2</sub>s de mamíferos e de veneno é bem conservada (KINI, 2003). A abundância relativa das PLA<sub>2</sub>s de veneno é geralmente relevante, e, similar a outras famílias de enzimas como as SVMPS, em um único veneno, diversas isoformas de PLA<sub>2</sub> podem estar presentes, exercendo uma alta gama de efeitos fisiopatológicos, o que reflete uma acelerada evolução Darwiniana (CALVETE et al., 2009).

As PLA<sub>2</sub>s de venenos de serpentes podem ser subdivididas de acordo com diferenças estruturais, sendo as presentes nos venenos da família Elapidae pertencentes ao grupo I, enquanto as que estão presentes em venenos da família Viperidae pertencem ao grupo II (GUTIÉRREZ et al., 2008; XIAO et al., 2017). A presença do ácido aspártico na posição 49 (Asp49-PLA<sub>2</sub>) confere um papel importante para a manutenção da atividade enzimática da proteína, pois favorece a ligação da PLA<sub>2</sub> com o Ca<sup>2+</sup>, cofator da enzima. Em algumas

isoformas, há a substituição do ácido aspártico por serina, asparagina, arginina, ou, mais frequentemente, lisina (Lys49-PLA<sub>2</sub>), o que promove a oclusão da ligação com o Ca<sup>2+</sup>, o que traz como consequência uma diminuição quase total na atividade enzimática da proteína (GUTIÉRREZ et al., 2008; GHAZARYAN et al., 2015; XIAO et al., 2017).

Apesar de tal substituição ocasionar a redução da atividade enzimática, as Lys49-PLA<sub>2</sub> possuem efeitos farmacológicos por mecanismos não relacionados com a hidrólise de fosfolipídios (TEIXEIRA et al., 2003; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Portanto, independentemente de sua função catalítica primária, no envenenamento ofídico, as PLA<sub>2</sub>s podem induzir vários efeitos fisiopatológicos, como mionecrose, anticoagulação, inibição da agregação plaquetária, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, hipotensão arterial, aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema (HARRIS et al., 2000; SINGH et al., 2000; TEIXEIRA et al., 2003; KINI, 2005b; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; RODRÍGUEZ et al., 2020)

Os danos locais causados pelas PLA<sub>2</sub>s estão relacionados aos efeitos inflamatórios e são um dos responsáveis pela letalidade e efeitos irreversíveis do envenenamento, como perda de membros e incapacitação do indivíduo (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978; GUTIÉRREZ et al., 2008; FUSCO et al., 2015). A capacidade das PLA<sub>2</sub>s causarem edema foi primeiramente demonstrada em PLA<sub>2</sub>s ofídicas, após provocarem edema de pata e degranulação de mastócitos *in vitro* (DAMERAU et al., 1975). A partir desses estudos tornou possível a utilização de PLA<sub>2</sub>s para ensaios de resposta inflamatória.

A atividade farmacológica das PLA<sub>2</sub>s pode estar relacionada à presença de receptores para a interação com a célula alvo e ativação de outras proteínas, incluindo outras PLA<sub>2</sub>s citossólicas (cPLA<sub>2</sub>s) e quinases que induzem a expressão das COX2 (RODRÍGUEZ et al., 2020). Esses eventos moleculares, em consequência, podem induzir um aumento significativo do estresse oxidativo, que pode levar à produção de endoperóxidos lipídicos, incluindo os provenientes do metabolismo do ácido araquidônico e os fosfolipídios da membrana. Essas alterações metabólicas podem, em última instância, levar ao desencadeamento de várias atividades farmacológicas, como a neurotoxicidade (PETROZZI et al., 2007), a mionecrose e a inflamação (SALZANO et al., 2014).

Outro efeito fisiopatológico proeminente das PLA<sub>2</sub>s é sua atividade anticoagulante. Diversas PLA<sub>2</sub>s de venenos apresentam tal atividade, sendo classificadas de acordo com a sua potência na coagulação (OUYANG; TETVG; HUANG, 1992; HIGUCHI et al., 2007; SAIKIA; MUKHERJEE, 2017). O principal mecanismo de ação anticoagulante da PLA<sub>2</sub>s é a hidrólise de fosfolipídios, cofator vital para a cascata de coagulação (KINI, 2005b). Porém, a ligação de PLA<sub>2</sub>s aos fatores de coagulação como FX e protrombina, inibindo sua ativação, em um mecanismo independente da ação catalítica, também foi evidenciado. Além disso, foram demonstradas que ações sinérgicas entre os mecanismos dependentes e independentes da ação catalítica potencializam a atividade anticoagulante (KINI, 2005b, 2006).

Diversas moléculas possuem capacidade inibitória sobre as PLA<sub>2</sub>s, incluindo inibidores químicos (SOARES et al., 2000), moléculas encontradas em plantas, animais e fungos, como flavonoides, alcaloides e outras proteínas (SOARES et al., 2005; MARCUSSI et al., 2007; TOYAMA et al., 2010; COTRIM et al., 2011), bem como as que são encontradas em plasma de serpentes (DUNN; BROADY, 2001; SAMY et al., 2012; CAMPOS et al., 2016; FORTES-DIAS et al., 2016; SERINO-SILVA et al., 2018).

### *1.1.3 Inibidores em plasma de serpentes (PLIs)*

O interesse pelo fenômeno da resistência inter/intra-espécies à toxicidade dos venenos de serpentes, juntamente com a busca de novas estratégias para o tratamento do envenenamento ofídico, resultaram na descoberta de proteínas que neutralizam os principais componentes tóxicos desses venenos. Tais inibidores possuem um potencial proeminente para neutralizar os efeitos causados pelo envenenamento ofídico (THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; SAMY et al., 2012).

A principal hipótese para a presença de tais inibidores no plasma de serpentes peçonhentas consiste na proteção contra o autoenvenenamento, que, em determinadas circunstâncias, pode-se difundir pelo seu sistema circulatório. No entanto, tal teoria não suporta a presença dos mesmos em serpentes não peçonhentas como *Elaphe quadrivirgata* (OKUMURA et al., 2003), *Elaphe climacophora* (SHIRAI et al., 2009), *Macropisthodon rudis* (ZHONG; HUANG, 2016), *Sinonatrix annularis* (LE et al., 2015; XIONG et al., 2017) e *Python* sp. (THWIN et al., 2002; DONNINI et al., 2011), cuja ocorrência sugere que seu papel

fisiológico não se restringe à proteção contra o autoenvenenamento, mas possui papel ainda não completamente compreendido (SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015).

Várias proteínas que interagem e inibem venenos foram associadas ao sistema imunológico inato (HOLDING; BIARDI; GIBBS, 2016; ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017). Diversos organismos multicelulares possuem sistemas imunológicos inatos relacionados sobretudo à proteção contra patógenos, inativando os próprios patógenos e/ou seus produtos tóxicos (GIBBS et al., 2020).

As características de resistência às substâncias tóxicas presentes no veneno podem estar ao encontro com o mecanismo de defesa de patógenos pelo sistema inato (GIBBS et al., 2020), sendo um mecanismo geralmente inespecífico que não requer exposição anterior, possui velocidade de resposta, e, no caso da regulação da expressão de inibidores, pode geralmente estar associada, por exemplo, com coevolução presa-predador (também conhecido como corrida armamentista) (HOLDING; BIARDI; GIBBS, 2016; ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017).

Tal hipótese suporta a presença de inibidores em serpentes não peçonhentas, uma vez que não é necessária a pré-exposição ao veneno para a ocorrência do inibidor, e sua expressão é positivamente regulada de acordo com a presença ou ausência de veneno. Outra hipótese levantada é a neofuncionalização de tais inibidores, cujos ancestrais estavam relacionados à inibição de proteínas fisiológicas e não tóxicas de serpentes (SHIRAI et al., 2010)

Já foi demonstrado a regulação positiva da expressão de inibidores com o contato frequente com o veneno (KINKAWA et al., 2010), ademais, existem evidências da variação quantitativa correlacionada com o desenvolvimento ontogenético em *B. jararaca* (GOMES et al., 2017). Diferentes porcentagens de recuperação de inibidores em duas espécies de serpentes não peçonhentas do mesmo gênero com hábitos alimentares distintos, sendo uma ofiófaga também foram demonstrados, sendo que a serpente ofiófaga apresentou maior quantidade de PLI do que a não ofiófaga (OKUMURA et al., 2003).

O maior número de proteínas plasmáticas com caráter inibitório conhecidas correspondem aos inibidores de SVMPs e de PLA<sub>2</sub>s, relacionados à miotoxicidade, neurotoxicidade e inflamação aguda, responsável sobretudo pelos danos teciduais locais e

efeitos sistêmicos como transtornos da coagulação (THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; TANAKA-AZEVEDO; TANAKA; SANO-MARTINS, 2003; SAMY et al., 2012; BASTOS et al., 2016).

Além disso, o potencial biotecnológico dos inibidores dessas enzimas pode fornecer modelos moleculares terapêuticos, com atividade antiofídica, para complementar a terapia sérica convencional contra essas enzimas multifuncionais, bem como para auxiliar na elucidação do mecanismo de interação das proteínas em questão, conferindo ao inibidor caráter farmacológico, como, por exemplo, o potencial anti-inflamatório (SAMY et al., 2012; XIAO et al., 2017).

Inibidores de PLA<sub>2</sub> (PLIs) são encontrados no plasma de diversas serpentes, peçonhentas ou não, e possuem um importante papel, principalmente na resistência desses animais aos venenos de serpentes (PICELLI et al., 2017), uma vez que as PLA<sub>2</sub>s são responsáveis por uma vasta gama de efeitos farmacológicos causados pelo envenenamento ofídico (KAKARLA; GOTTSCHALK, 2014; MURAKAMI et al., 2014). Além disso, acredita-se que as primeiras toxinas estejam relacionadas com a fosfolipase, uma vez que esta é a toxina mais difundida, sendo encontrada em quase todos os grupos de serpentes peçonhentas e talvez também nas não peçonhentas (KOCHVA, 1987).

Em razão da semelhança estrutural e de catálise entre as PLA<sub>2</sub>s de venenos e as humanas, os PLIs também são considerados com grande potencial para o descobrimento de novos agentes terapêuticos relacionados com as desordens inflamatórias e com a elucidação da relação estrutura-função entre PLA<sub>2</sub>s e PLIs, sendo a interação do PLI com a proteína-alvo essencial para o entendimento do papel dessa molécula, tanto com relação à função fisiológica, como ao seu potencial biotecnológico (FORTES-DIAS et al., 2016). Outras ações também foram descritas pelos PLIs, como por exemplo a ação anti-tumoral, anti-angiogênica e anti-metastática (GIMENES et al., 2017).

Já foi demonstrado que a pré-incubação de PLI com o antiveneno policlonal pode potencializar a eficácia contra os efeitos locais como a miotoxicidade do veneno (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Porém, o uso comercial desses inibidores ainda é questionado pela quantidade necessária, bem como aspectos ecológicos da purificação desses inibidores do soro de serpentes (FORTES-DIAS et al., 2016). A produção de forma recombinante vem sendo

explorada (OKUMURA et al., 1999; LE et al., 2015; GIMENES et al., 2020), bem como a investigação *in silico* de peptídeos derivados de PLIs com ação inibitória contra PLA<sub>2</sub>s também são alvos de investigação (SOBRINHO et al., 2019).

A produção dos PLIs ocorre no fígado, que é o órgão com maior produção de proteínas plasmáticas, permitindo que tais proteínas se difundam na corrente sanguínea, resultando, portanto, em um melhoramento no mecanismo de proteção contra o envenenamento ofídico. Tal mecanismo tornaria essas moléculas parte de uma resistência natural desses animais, sendo as serpentes peçonhentas ou não (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; KINKAWA et al., 2010; LIMA et al., 2011; SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015).

Além disso, os receptores de PLA<sub>2</sub>s e os PLIs possuem similaridade estrutural e estão em forma solúvel, sugerindo que tais inibidores podem regular a atividade pró-inflamatória das PLA<sub>2</sub>s (DUNN; BROADY, 2001; SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015), podendo atuar na inibição da atividade edematogênica e miotóxica (THWIN et al., 2002; OLIVEIRA et al., 2008; SANTOS-FILHO et al., 2011).

Os PLIs podem ser encontrados em serpentes das famílias Elapidae, Viperidae, Hydrophidae, Colubridae e Boidae. Em relação à sua conformação, os PLIs podem ser homo ou hetero-oligoméricos, possuem massa entre 75 e 180 kDa e seu mecanismo de ação envolve a formação de um complexo solúvel através da interação do PLI com a enzima em questão (LIZANO et al., 2000). Comumente são glicoproteínas, porém o carboidrato não é essencial para sua atividade inibitória, uma vez que em sua ausência, alguns inibidores continuam ativos (CAMPOS et al., 2016). Ademais, tais inibidores são bem estáveis, sendo resistentes a ambientes acídicos, alcalinos e altas temperaturas (AOKI-SHIOI; MODAHL, 2019).

Em razão de suas diferenças estruturais, tais inibidores podem ser classificados em três grupos de acordo com sua conformação: PLI $\alpha$ , PLI $\beta$  e PLI $\gamma$  (FORTES-DIAS et al., 2016), cujos domínios estão relacionados com a interação entre o inibidor e a PLA<sub>2</sub> (FORTES-DIAS et al., 2016). Diferentes tipos de PLIs, mais especificamente PLI $\alpha$  e PLI $\gamma$ , podem ocorrer simultaneamente na mesma serpente. O PLI $\beta$  é a isoforma mais rara, sendo identificado em três espécies de serpentes (XIAO et al., 2017). Ademais, os PLIs podem possuir diferentes afinidades dependendo da isoforma de PLA<sub>2</sub>. Quando sua ação é estritamente em Lys-49 ou

Asp-49 PLA<sub>2</sub>s que possuem atividade miotóxica, eles podem ser denominados inibidores de miotoxinas (MIPs) (QUIRÓS et al., 2007; OLIVEIRA et al., 2011; XIAO et al., 2017).

Apesar do grande número de estudos descrevendo a purificação e a caracterização do potencial inibitório de diferentes PLIs, seu exato mecanismo de ação e sítios de ligação permanecem abertos à investigação, principalmente em razão das ações distintas dos grupos de PLIs em relação à diferentes PLA<sub>2</sub>s (AOKI-SHIOI; MODAHL, 2019). Entretanto, estudos sugerem que seu mecanismo de ação ocorre através da formação de um complexo não covalente entre o PLI e a PLA<sub>2</sub> (THWIN et al., 2000; SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015; SERINO-SILVA et al., 2018).

#### *1.1.3.1 Inibidores Classe $\alpha$*

Os PLI $\alpha$ s possuem como característica um domínio característico lectina tipo C (CTLD), que se assemelha ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) de lectinas dependentes de Ca<sup>2+</sup>. Porém, o CRD dos PLI $\alpha$ s não possui os resíduos de aminoácidos relacionadas à ligação com Ca<sup>2+</sup>, tornando-os Ca<sup>2+</sup> independentes. Esta região corresponde a aproximadamente 67% da sequência primária dos monômeros de inibidores de PLA<sub>2</sub> do tipo alfa e é a parte da molécula mais conservada, contrastando com a baixa homologia sequencial destes inibidores, que possuem 46% de identidade, em média (OHKURA et al., 1993; SANTOS-FILHO et al., 2011).

Em geral, são proteínas oligoméricas glicosiladas compostas por quatro subunidades de 20 a 24 kDa, sendo que as subunidades, após a deglicosilação, apresentam uma perda de aproximadamente 15% de sua massa (OHKURA et al., 1993; SANTOS-FILHO et al., 2011). A especificidade de sua ação inibitória é variável, sendo que alguns inibidores investigados possuem especificidade por PLA<sub>2</sub>s ácidas do grupo IIA (INOUE et al., 1997; NOBUHISA et al., 1998), enquanto outros possuem afinidades mais abrangentes, englobando as isoformas Asp-49 e Lys-49 PLA<sub>2</sub>s do grupo IIA (LIZANO et al., 1997; OLIVEIRA et al., 2008). No entanto, os mecanismos que proporcionam as diferentes especificidades ainda não foram elucidados (SANTOS-FILHO et al., 2011)

Apesar de estudos apresentarem a identificação e o isolamento de diferentes PLI $\alpha$ s, o mecanismo de ação permanece desconhecido, porém há a hipótese em que as PLA $_2$ s poderiam se ligar ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) da molécula inibidora (SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017). Tal hipótese é sustentada por estudos feitos por LAMBEAU et al., (1990), que mostrou que a PLA $_2$  interage com domínios CRD. Além disso, uma região altamente conservada entre os resíduos 49-143 pode estar relacionada com a ligação com a proteína-alvo (HAINS; BROADY, 2000).

### 1.1.3.2 Inibidores Classe $\beta$

Os inibidores de tipo beta (PLI $\beta$ ) são glicoproteínas ácidas e ricas em leucina com massa molecular de 150-160 kDa. Sua estrutura geralmente é trimérica, com monômeros de ~50 kDa, podendo ser homo ou hetero-oligoméricas. Porém, mesmo nas moléculas hetero-oligoméricas, os monômeros apresentam alta homologia.

Sua estrutura primária é característica pela presença de leucina na região N-terminal, denominadas como leucine-rich repeat (LRRs) *in tandem*. Este arranjo particular cria moléculas em forma de ferradura. Ademais, sua região C-terminal é rica em cisteína (SHIRAI et al., 2009).

Os PLI $\beta$ s possuem atividade inibitória apenas contra as PLA $_2$  básicas pertencentes ao grupo AII. Além disso, sua conformação possui similaridades com glicoproteínas  $\alpha 2$  humanas (OKUMURA et al., 1999). Seu mecanismo de ação geralmente possui especificidade por PLA $_2$ s que possuem os resíduos His1, Arg6, Glu17 e Trp70, e estudos sugerem que a interação dos PLIs com tais resíduos é responsável pelo impedimento ao acesso do sítio catalítico (LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003). Estudos *in silico* também sugerem que uma região carregada negativamente na porção N-terminal e os motivos LRR 1-6 do Cdtsb $\beta$ PLI estejam relacionadas com a interação inibidor:proteína-alvo (FORTES-DIAS et al., 2019).

O primeiro PLI $\beta$  descrito na literatura foi purificado a partir do soro da serpente *Gloydus brevicaudus* como homotrímero. O inibidor é específico para PLA $_2$ s básicas de veneno e forma um complexo estável com uma proporção molar 1:1. (SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015; SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017). A partir de então, estes inibidores também já foram encontrados em outras espécies de serpentes como *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (OKUMURA et al., 1999), *Elaphe quadrivirgata* e *E.*



*climacophora* (OKUMURA et al., 2003; SHIRAI et al., 2009), as quais pertencem à família Viperidae e Colubridae, respectivamente.

### 1.1.3.3 Inibidores Classe $\gamma$

Os inibidores tipos gama (PLI $\gamma$ ) são glicoproteínas ácidas caracterizadas por duas unidades estruturais de repetições altamente conservadas de meias cisteínas, conhecidas como motivos de três dedos (*Three finger motifs*), como as encontradas em proteínas pertencentes à família Ly-6, ativador de plasminogênio tipo uroquinase e alfa-neurotoxinas (OHKURA et al., 1994). Outra característica importante da maioria dos PLI $\gamma$ s é a presença de uma região altamente conservada e rica em prolina, encontrada em segmentos da proteína, e estas regiões desempenham um papel estrutural importante, garantindo a integridade e conformação dos sítios de interação em proteínas funcionais (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008).

Os PLI $\gamma$ s podem ser homo ou hetero-oligoméricos, sendo os últimos usualmente compostos de duas subunidades diferentes com estruturas primárias distintas (chamadas  $\alpha$  e  $\beta$ , ou A e B), sob uma proporção 2:1 para A e B, respectivamente (CAMPOS et al., 2016; SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017). Seu oligômero possui de 90 a 130 kDa, ligados por interações não covalentes (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008). Em razão dos diferentes oligômeros, os PLI $\gamma$ s podem ser classificados em subclasses I e II, sendo a subclasse I composta por hetero-oligômeros. A subclasse II, no entanto, possui inibidores homo/hetero-oligoméricos (CAMPOS et al., 2016).

A menor ocorrência da subunidade B leva a uma mistura heterogênea entre os oligômeros. Ademais, um caráter ancestral foi relacionado a tal subunidade. Tal conformação heterogênea pode levar a diferentes conformações e explica em parte as diferentes afinidades entre inibidores e isoformas de PLA<sub>2</sub>s (DUNN; BROADY, 2001; SO et al., 2008, 2011)

Até o momento, foram identificados PLI $\gamma$ s em cinco famílias de serpentes (Elapidae, Hydrophiidae, Viperidae, Colubridae, e Boidae) (SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015) e estão relacionados com a inibição das atividades fisiopatológicas das PLA<sub>2</sub>s como atividades inflamatórias, anticoagulantes, miotóxicas, edematogênicas, citotóxicas, bactericidas e, conseqüentemente, atividades letais (NOBUHISA et al., 1997).

Sua atividade inibitória é mais abrangente, uma vez que possui atividade contra PLA<sub>2</sub>s básicas ou ácidas dos grupos I, II e III (SANTOS-FILHO; SANTOS, 2017). Tal abrangência inibitória pode ocasionar em implicações farmacológicas interessantes, como a neutralização de PLA<sub>2</sub>s secretórias humanas relacionadas à inflamação (SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015). Neste contexto, o PLI<sub>γ</sub> da serpente *Sinonatrix annularis* possuiu atividade anti-inflamatória elucidada em ensaio de inflamação induzida por carragenina, demonstrando um potencial inibitório além das ações farmacológicas do envenenamento (ZHANG et al., 2018).

Diversos inibidores foram isolados ou identificados por transcriptoma de fígado de serpentes (DUNN; BROADY, 2001; OKUMURA et al., 2003; OLIVEIRA et al., 2008; SHIRAI et al., 2009; SANTOS-FILHO et al., 2011; GOMES et al., 2017), incluindo estudos que identificaram inibidores em serpentes não peçonhentas (KINKAWA et al., 2010; LE et al., 2015; ZHONG; HUANG, 2016; XIONG et al., 2017).

#### 1.1.4 *Boa constrictor*

A espécie *Boa constrictor* (Boidae), popularmente conhecida como jiboia, é uma das maiores serpentes não peçonhentas do mundo, possuindo tamanhos superiores a 3 m (SAVAGE; BOLAÑOS, 2009). Possui como característica a habilidade constritora, estratégia de caça de emboscada e cauda preênsil curta, crânios grandes, angulares mas flexíveis, com altas contagens de dentes pequenos e recurvados, pupilas verticais, escamas da barriga estreitas, não possuem fossetas labiais termorreceptoras e possuem uma alta variação de padrão de cor (REED; RODDA, 2013). Possuem dimorfismo sexual, cujas fêmeas geralmente apresentam tamanhos superiores aos machos e possuem maior massa, mesmo com machos de tamanhos semelhantes (PIZZATTO; MARQUES, 2007). Além do tamanho, indivíduos desta espécie possuem restos vestigiais de cintura pélvica visível externamente, sendo maiores nos machos do que nas fêmeas (REED; RODDA, 2013).

Sua distribuição é uma das mais amplas em latitude do mundo (REED; RODDA, 2013). É largamente encontrada na América do Sul, sendo comumente encontrada no Brasil, desde a Amazônia até o Rio de Janeiro (ALBINO; CARLINI, 2008). Sua dieta é considerada generalista, e oportunista, sendo registrados predação de anfíbios, répteis, aves e mamíferos (QUICK et al., 2005; PIZZATTO; MARQUES; FACURE, 2009; ROCHA-SANTOS; BARBIER; BORDIGNON, 2014; SANCHES et al., 2018).

Estudos relacionados aos seus metabólitos são escassos, porém o potencial antimicrobiano e anti-inflamatório de seu óleo foi descrito, uma vez que seu óleo já possui uso etnofarmacológico por comunidades tradicionais na América do Sul, sendo utilizado de forma tópica para reumatismo, osteoporose, paralisia facial e outras contusões (FALODUN; OWOLABI; OSAHON, 2008; SCHMEDA-HIRSCHMANN et al., 2014).

Apesar da presença de um PLI $\gamma$  ter sido identificada no plasma da serpente *Boa constrictor* (FORTES-DIAS et al., 2020), o isolamento e a caracterização deste inibidor ainda são desconhecidos. Ademais, estudos de inibição da atividade anticoagulante, bem como a avaliação da ação inibitória em veneno total de serpentes cuja dieta se baseia em serpentes são escassos. Assim, este estudo pretende purificar e caracterizar o PLI do soro da serpente *Boa constrictor*, visando entender seu mecanismo de inibição, avaliando o potencial uso dessa molécula como auxílio à terapia antiveneno, bem como auxiliar na elucidação da fisiologia destes animais, que poderá trazer informações sobre a importância desse PLI no plasma de uma serpente não peçonhenta.

## CAPÍTULO 2

Isolamento e caracterização estrutural e funcional do Boa $\gamma$ PLI através de PLA<sub>2</sub>s isoladas. Esse capítulo possui resultados já publicados (RODRIGUES, C. F. B.; SERINO-SILVA, C.; DE MORAIS-ZANI, K.; KAVAZOI, V. K.; CARVALHO, M. P. N.; GREGO, K. F.; CHIARELLI, T.; TASHIMA, A. K.; TOYAMA, M. H.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Boa $\gamma$ PLI: 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, p. e0229657, 2020.) (ANEXO 1).

## 2.1 INTRODUÇÃO

O envenenamento por serpentes, reclassificado como doença tropical negligenciada pela Organização Mundial da Saúde (OMS), pode ter graves consequências fisiopatológicas (GUTIÉRREZ; THEAKSTON; WARRELL, 2006; WILLIAMS et al., 2010; CHIPPAUX, 2017). As ações fisiopatológicas do envenenamento estão relacionadas às toxinas presentes no veneno, que consistem principalmente em proteínas, cujas atividades podem promover distúrbios homeostáticos, neuromotores, inflamatórios e da coagulação sanguínea (GUTIÉRREZ; ESCALANTE; RUCAVADO, 2009; CALVETE, 2017; GUTIÉRREZ et al., 2017)

As PLA<sub>2</sub>s são um grupo de enzimas de baixa massa molecular (~ 13 a 15 kDa), que estão relacionadas à clivagem, dependente de cálcio, na posição sn-2 dos fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácido araquidônico, sendo o último precursor da cascata inflamatória (MURAKAMI; TAKETOMI, 2015). As PLA<sub>2</sub>s de venenos, entre outras classificações, podem ser separadas em dois subgrupos: Asp49-PLA<sub>2</sub> e Lys49-PLA<sub>2</sub>. A variante Asp49-PLA<sub>2</sub> possui alta atividade enzimática. Quando ocorre a substituição do resíduo de aminoácido na posição 49, sendo a mais comum a substituição por Lys-49, ocorre uma perda na capacidade de ligação do cálcio, resultando em uma redução severa de sua atividade enzimática (ARNI; WARD, 1996; KINI, 2003).

No entanto, as ações farmacológicas da PLA<sub>2</sub>s não estão relacionadas apenas à sua atividade enzimática, sendo responsáveis pela miotoxicidade, neurotoxicidade e distúrbios inflamatórios no envenenamento por serpentes. Esta proteína também é responsável por danos locais aos tecidos, letalidade e efeitos irreversíveis, como danos musculares e perda de membros, levando à incapacitação individual (HABERMANN; BREITHAUPT, 1978; GUTIÉRREZ et al., 2008; FUSCO et al., 2015).

Além disso, eles também têm ação anticoagulante, cardiotoxica e de indução / inibição da agregação plaquetária (KINI, 2003; MURAKAMI et al., 2014). Diversas moléculas têm capacidade inibitória contra a atividade de PLA<sub>2</sub>s, algumas das quais foram identificadas por transcriptoma de fígado ou isoladas de plasma de serpentes. (DUNN; BROADY, 2001; SAMY et al., 2012; CAMPOS et al., 2016; FORTES-DIAS et al., 2016; GOMES et al., 2017). Técnicas

*in silico* também foram usadas para pesquisar potenciais inibidores (CHINNASAMY et al., 2020).

A principal hipótese para a presença de inibidores de PLA<sub>2</sub> (PLIs) em serpentes peçonhentas é a proteção contra o autoenvenenamento. No entanto, tal teoria não suporta sua presença em serpentes não peçonhentas (THWIN et al., 2002; SO et al., 2008; SHIRAI et al., 2009; ZHONG; HUANG, 2016), cuja ocorrência sugere que seu papel fisiológico não se restringe à proteção contra o autoenvenenamento, mas tem um papel ainda não completamente compreendido (SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015).

Os PLIs podem ser homo ou hetero-oligoméricas e geralmente são glicoproteínas, mas o carboidrato não é essencial para sua atividade inibitória (CAMPOS et al., 2016). Devido às suas diferenças estruturais, tais inibidores podem ser classificados em três grupos:  $\alpha$ PLI,  $\beta$ PLI, e  $\gamma$ PLI, cujos domínios estão relacionados à interação entre o inibidor e PLA<sub>2</sub> (FORTES-DIAS et al., 2016).

O  $\gamma$ PLI de *Boa constrictor* já foi identificado por análise transcriptômica (FORTES-DIAS et al., 2020), mas sua caracterização funcional ainda não foi relatada. Diante do contexto, o potencial biotecnológico desses inibidores pode fornecer modelos moleculares terapêuticos com atividade antiofídica para complementar a soroterapia convencional contra essas enzimas multifuncionais, bem como seu potencial anti-inflamatório, uma vez que existe uma similaridade estrutural e catalítica entre o veneno e as PLA<sub>2</sub>s humanas, além de contribuir para a elucidação do mecanismo de interação PLA<sub>2</sub>-PLI.

Neste âmbito, isolamos um  $\gamma$ PLI do plasma da *Boa constrictor*, denominado Boa $\gamma$ PLI, e o caracterizamos estruturalmente (estrutura primária e secundária e sua oligomerização) e funcionalmente por efeitos inibitórios nas atividades enzimática, edematogênica, miotóxica e anticoagulante das proteínas isoladas Asp-49 e Lys-49 PLA<sub>2</sub> (RODRIGUES et al., 2020).

## 2.2 OBJETIVOS

### 2.2.1 Objetivos gerais

O objetivo deste trabalho consiste na identificação e no isolamento de PLI a partir do soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*, bem como sua caracterização estrutural e funcional, avaliando a atividade inibitória e de interação com duas isoformas de PLA<sub>2</sub> (Asp-49 e Lys-49), isoladas das serpentes *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops jararacussu*, respectivamente.

### 2.2.2 Objetivos específicos

- Purificação de PLI presente no soro da serpente não peçonhenta *Boa constrictor* mediante o uso de cromatografia de troca iônica e afinidade;
- Caracterização de sua estrutura primária e secundária através de técnicas como espectrometria de massas e dicroísmo circular;
- Avaliação de seu caráter inibitório *in vitro* e *in vivo* por meio de espectrofotometria e ensaios farmacológicos como edema de pata e miotoxicidade;
- Investigação da interação com a proteína alvo através de ensaios de fluorescência e *western blotting*.
- Investigação da ação inibitória na atividade anticoagulante da crotoxina (PLA<sub>2</sub> isolada de *Crotalus durissus terrificus*).

## 2.3 MATERIAL E MÉTODOS

### 2.3.1 Comitê de Ética

Todos os experimentos envolvendo animais foram aprovados pelo Comitê de Ética nº 6916110917 e os experimentos estão de acordo com os padrões estabelecidos pelas leis brasileiras para uso de animais experimentais e com os princípios éticos adotados pelo Colégio Brasileiro de Experimentação Animal (COBEA).

### 2.3.2 Venenos

Os venenos das serpentes *B. jararacussu* e *C. d. terrificus* foram fornecidos pelo Laboratório de Herpetologia do Instituto Butantan. A obtenção do veneno ocorreu por extração manual, seguida pela centrifugação a 1700 x g por 15 minutos, liofilização e armazenamento a -20 °C, até o momento da análise.

### 2.3.3 Soro

O sangue de *B. constrictor* (1 % de seu peso) foi coletado por punção da veia paravertebral, utilizando seringas plásticas. O sangue foi mantido por cerca de 18 hrs a 4 °C, para que ocorresse coagulação, previamente à centrifugação, que ocorreu a 1200 x g à temperatura ambiente por 15 minutos, por fim, foi estocado a -20 °C.

### 2.3.4 Purificação da Asp-49 PLA<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* e Lys-49 PLA<sub>2</sub> de *Bothrops jararacussu*

A purificação da Asp-49 PLA<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* foi realizada em duas etapas cromatográficas segundo OLIVEIRA et al., (2002) com modificações. Na primeira fase, o veneno foi fracionado em uma cromatografia de gel filtração, coluna Superdex 75 (GE Healthcare), com tampão 50 mM Tris 100 mM NaCl, pH 7.4, por 250 minutos a 1 mL/min. Posteriormente, para alguns testes como atividade enzimática, dicroísmo circular, fluorescência, edema e miotoxicidade, a crotoxina A (crotopotina) foi dissociada da crotoxina B (PLA<sub>2</sub>) através de uma nova cromatografia de fase reversa com coluna C5 (Supelco C5 column, 0.10 cm × 25 cm). A coluna cromatográfica foi previamente equilibrada com solução A (TFA 0,1%). A eluição da PLA<sub>2</sub> foi realizada com um gradiente linear contínuo de solução B (66% acetonitrila em TFA 0,1%) e o monitoramento do perfil cromatográfico foi a 280 nm em um cromatógrafo Jasco (detector UV-2077). Em seguida as amostras foram liofilizadas para posteriores análises.



A purificação da Lys-49 PLA<sub>2</sub> de *Bothrops jararacussu* foi realizada de acordo com SOARES et al., (1998), com algumas modificações. O veneno (100 mg) foi fracionado em uma coluna de troca iônica CM (GE Healthcare, 5 mL), com um gradiente linear (0 a 100%) de bicarbonato de amônio 0.05 M para bicarbonato de amônio 1 M, pH 7.9, em fluxo de 1 mL / min. O monitoramento foi a 215 nm em um cromatógrafo Akta Purifier (GE Healthcare), e as frações contendo a PLA<sub>2</sub> foram coletadas e liofilizadas para as análises posteriores.

### 2.3.5 Purificação do PLI

#### 2.3.5.1 Cromatografia de troca iônica

O soro de *Boa constrictor* (5 mL) foi diluído em 5 mL de tampão Tris 25 mM pH 7,5 (tampão A) e aplicado em uma coluna de troca aniônica (HiTrap DEAE FF 5 mL, GE Healthcare), previamente equilibrada com 95% de tampão A (Tris 25 mM, pH 7,5) e 5% de tampão B (Tris 25 mM, NaCl 1 M pH 7,5) em um cromatógrafo Akta Purifier (GE). A eluição foi feita, inicialmente, mantendo o tampão B a 10% (NaCl 100 mM) e então com um gradiente de 10 a 50% de B (NaCl 500 mM). A corrida foi mantida em um fluxo de 1 mL / min, monitorada em 280 nm, sendo as amostras fracionadas a cada 5 mL. Após a cromatografia, as frações proteicas foram agrupadas em *pools*. A dessalinização dos *pools* foi feita por diálise em PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, pH 7,4) durante 24 horas a 4°C.

#### 2.3.5.2 Cromatografia de afinidade

Em uma coluna de afinidade previamente montada pelo acoplamento da crotoxina em uma matriz Sepharose CNBr-ativada (GE Healthcare), segundo recomendação do fabricante e equilibrada com PBS (NaCl 140 mM, KCl 2,6 mM, Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub> 10 mM, KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub> 1,7 mM, pH 7,4), foi aplicado o *pool* contendo a atividade inibitória sobre a PLA<sub>2</sub> (proveniente da cromatografia em HiTrap DEAE FF). O material não adsorvido foi retirado por extensa lavagem com PBS. Posteriormente, as proteínas adsorvidas à resina foram eluídas com gradiente não linear de glicina 0,1 M pH 2,7, fracionadas em microtubos, sendo o pH das frações neutralizado pela adição de tampão Tris 1 M pH 8,8. A eluição foi dosada manualmente em espectrofotômetro com absorvância a 280 nm.

### 2.3.5.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS (SDS-PAGE)

As amostras do soro e PLI isolado foram submetidas à SDS-PAGE 12%, de acordo com (LAEMMLI, 1970) em condições redutoras ou não. 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 (GE Healthcare).

### 2.3.6 Espectrometria de massas (*nanoESI-qTOF*)

#### 2.3.6.1 Digestão das bandas de SDS-PAGE para identificação do inibidor

A banda que contém o PLI presente no SDS-PAGE, proveniente da purificação em cromatografia de afinidade, na condição reduzida, foi excisada e submetida à digestão *in gel*. Primeiramente, a banda foi incubada em solução 50% metanol com 5% de ácido acético, seguido da desidratação do gel por 10 min em 200 µL de acetonitrila. O fragmento do gel então foi reidratado com 100 µL de 1,4-ditiotreitol 5 mM (DTT) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM por 25 minutos a 56 °C. Em seguida, a amostra foi incubada com iodoacetamida 14 mM (IAA) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM, à temperatura ambiente, no escuro, por 30 minutos. Na sequência, a amostra foi incubada novamente com DTT 5 mM, à temperatura ambiente, por 15 minutos. Foi então adicionado cloreto de cálcio 1 mM e tripsina 20 ng / µL (na proporção enzima:substrato 1:100) em solução de bicarbonato de amônio 50 mM. A amostra foi incubada por 16 horas a 37 °C. Após a incubação, foi adicionado ácido fórmico 0,4% e a amostra centrifugada a 2500 x g por 10 minutos à temperatura ambiente. O sobrenadante resultante foi seco em um sistema de concentração a vácuo (miVac–Gene Vac) e armazenados a -20 °C, até o momento da análise.

#### 2.3.6.2 Análises das amostras digeridas por espectrometria de massas - “Data Independent Acquisition”

Os peptídeos resultantes da digestão foram ressuspensos em ácido fórmico 0,1%, aos quais foram adicionados 15 µL de álcool desidrogenase – ADH (Waters MassPrep, P00330) 1 nmol / L, para a análise quantitativa das amostras. Alíquotas de 5 µg dos peptídeos digeridos da amostra foram aplicadas em um sistema de cromatografia nanoAcquity UPLC (Waters) acoplado a um espectrômetro de massas Synapt G2 HDMS (Waters). As amostras foram injetadas em uma coluna trap (C18 nanoAcquity trap Symmetry de 180 µm x 20 mm, Waters) com 0,1% de ácido fórmico. As amostras foram eluídas em uma coluna analítica capilar (C18 nanoAcquity BEH 75 µm x 200 mm, 1,7 µm) usando um gradiente de 93% de solução A (ácido

fórmico 0,1%) e 7% de solução B (acetonitrila 99,9% e ácido fórmico 0,1%), até atingir 35% dessa segunda solução, durante 92 minutos, em um fluxo de 275 nL / min. Os dados foram adquiridos pelo espectrômetro de massas no modo de aquisição HDMSE, alternando-se os modos de baixa energia (4 eV) e de alta energia de colisão com rampa de 19-45 eV a cada 1,25 segundos. O espectrômetro de massas foi calibrado antes do uso e durante a corrida analítica, a cada intervalo de 30 segundos, utilizando a fonte nanoLockSpray com o peptídeo GFP-b (glufibrinopeptídeo, Waters). Ambas as amostras foram analisadas em triplicata.

### 2.3.6.3 Identificação de proteínas por busca em banco de dados

Os dados adquiridos pelo espectrômetro de massas foram processados pelo ProteinLynx Global Server 3.0.1 (Waters) com limites de contagens para baixa, alta energia e de intensidade de 50 e 750 e 1200, resolução do TOF e largura dos picos automáticas e m/z do calibrante para carga +2 de 785,8426 com janela de 0,2 Da. As buscas no banco de dados foram realizadas com os seguintes parâmetros: carbamidometilação das cisteínas como modificação fixa, oxidação das metioninas, acetilação dos N-terminais e deaminação das asparaginas e glutaminas como modificações variáveis, perda de até duas clivagens da tripsina e configuração automática para tolerâncias de massas dos íons precursores e dos fragmentos. Os limites utilizados para identificação foram: mínimo de 1 fragmento por peptídeo, 5 fragmentos por proteína, 2 peptídeos por proteína e taxa máxima de falsos positivos de 5%, estimada pela busca simultânea com um banco de dados reverso.

### 2.3.7 Dicroísmo circular

A espectroscopia por dicroísmo circular (CD) é um método experimental de análise apropriado para avaliar a estrutura secundária de proteínas (alfa hélices, folhas-beta, voltas e estruturas secundárias aleatórias) em solução. Nesta técnica é utilizada luz circulante polarizada na faixa do ultravioleta (UV) distante (~180 a 260 nm). Para tal, uma alíquota da PLA<sub>2</sub> (30 µg), PLI isolado (30 µg) ou da mistura incubada (PLA<sub>2</sub>-PLI, 1:1), foi submetida ao ensaio de dicroísmo circular. As proteínas, diluídas em tampão Tris-HCl 0,002 M, contendo NaCl 0,015 M e CaCl<sub>2</sub> 0,1 mM (pH 8), foram submetidas à varredura de comprimentos de onda de 190 a 260 nm (1 nm / s) sob 8 convoluções (J815 *spectropolarimeter*, Jasco, Japão). Toda a análise foi subtraída da leitura do tampão utilizado. 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).

### 2.3.8 Análises cromatográficas de interações do inibidor com a PLA<sub>2</sub>

As amostras de PLA<sub>2</sub> isoladas, incubadas com o PLI, bem como o PLI isolado, foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular (BioSep SEC-s2000, Phenomenex) com tampão Tris HCl 0,05 M, NaCl 0,05 M, pH 8, com fluxo de 1 mL / min. Tal análise foi realizada para monitorar a formação de complexos entre as PLA<sub>2</sub> e o PLI, averiguar a característica da ligação, bem como analisar mudanças estruturais na PLA<sub>2</sub>. As análises dos dados de arranjo de diodo (PDA) foram performadas através do detector MD-2018 (Jasco, Japão), com monitoramento a 280 nm. Para comparação de massa molecular, o padrão Gel Filtration Standart (BioRad) foi utilizado.

### 2.3.9 Ensaio de Emissão de Fluorescência

Para investigação da interação da PLA<sub>2</sub> com o PLI, ensaios de varredura de emissão da fluorescência intrínseca das proteínas foram realizados. As proteínas isoladas (100 µg) e incubadas na concentração 1:1, diluídas em NaCl 0,9%, foram submetidas à excitação a 280 nm, seguidas por monitoramento da emissão de sua fluorescência no intervalo de comprimentos de onda 300 nm a 400 nm (J815 *spectropolarimeter*, Jasco). Os ensaios foram realizados com 5 convoluções, as diluições dos incubados acertadas, e os dados plotados em intensidade relativa, onde a emissão máxima do PLI isolado foi utilizada como 100 %. Toda as leituras foram subtraídas da leitura do tampão utilizado (NaCl 0,9%). Os dados foram exportados pelo software Spectra manager.

### 2.3.10 Western Blotting

A metodologia foi aplicada para investigar a interação do PLI com a PLA<sub>2</sub>. As proteínas presentes no soro e o PLI isolado, após eletroforese (item 3.6), foram transferidos para uma membrana de PVDF (GE Healthcare), previamente equilibrada em tampão de transferência (Tris 25 mM, glicina 39 mM, metanol 20%, SDS 0,037%, pH 9,2) em um sistema Trans-Blot Turbo Transfer (Bio-Rad) em uma corrente constante de 2,5 A e 25 V por 35 min. Logo após, a membrana foi incubada com solução bloqueadora (leite desnatado 5% e tween 20 0,01%) por 15 horas a 4 °C. Em seguida, a membrana foi incubada com a PLA<sub>2</sub> diluída 1:200 em solução de incubação (leite desnatado 0,5% e tween 20 0,01%), por 1 hora a temperatura ambiente. A membrana foi então incubada com o anticorpo anti-crotálico, diluído 1:1000 em solução de incubação, por 2 horas, a temperatura ambiente. A membrana foi incubada com o conjugado imunoenzimático (anti-IgG de cavalo conjugado com peroxidase) diluído 1:10000 em tampão

de incubação por 2 horas a temperatura ambiente. A reação foi revelada adicionando-se substrato cromogênico (5 mg de DAB - 3,3'diaminobenzidina tetrahidrocloro), 10 mL de tampão imidazol 0,1 M, 125 µL de CoCl<sub>2</sub> 0,2 M e 3,4 µL de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 30%). A reação então foi interrompida pela adição de água destilada.

### *2.3.11 Caracterização enzimática da PLA<sub>2</sub> e Neutralização.*

Em razão da perda da atividade enzimática da Lys-49 PLA<sub>2</sub>, apenas a Asp-49 PLA<sub>2</sub> foi utilizada nesse teste. A enzima foi solubilizada com solução salina NaCl 0,85%, na concentração de 1 mg / mL e incubada com o inibidor (2,0 mg / mL, 1,5 mg / mL, 1,0 mg / mL e 0,5 mg / mL) por 10 minutos. Foi usado o substrato cromogênico derivado do p-nitroanilida, 4-nitro-3-octanoyloxy-benzoic acid (NOB) (Enzo Life Sciences), que foi solubilizado em acetonitrila P.A a 3 mM. Então foi adicionado ao tampão Tris-HCl 0,01 M, NaCl 0,10 M e CaCl<sub>2</sub> 0,01 M pH 8 e analisados com leitura em espectrofotômetro UV-VIS SPECTRA MAX (Molecular Devices, CA), com comprimento de onda a 425 nm em placas de 96 poços. As leituras ocorreram ao longo do tempo (90 minutos), com intervalos de 5 minutos entre as leituras. As absorbâncias da última leitura foram transformadas em atividade específica, sob unidade de (nmol / mg / min). Tal avaliação indicou o potencial inibitório do PLI sob a atividade enzimática da PLA<sub>2</sub>, bem como se há caráter de dose resposta. A partir de tal, a porcentagem de inibição foi determinada.

### *2.3.12 Ensaios farmacológicos*

#### *2.3.12.1 Animais*

Foram utilizados camundongos Swiss (18 a 22 g), fornecidos pelo Biotério Central do Instituto Butantan. Os protocolos experimentais foram realizados mediante aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais do Instituto Butantan (CEUAIB). O biotério foi climatizado com umidade e temperatura controlada e os animais foram tratados com água e ração *ad libidum* e controle do ciclo 12 horas claro/escuro. Os animais foram mantidos de acordo com as normas do Colégio Brasileiro de Experimentação Animal-COBEA.

### 2.3.12.2 Avaliação do edema de pata.

O edema da pata foi induzido por injeção subplantar em camundongos Swiss machos (18 a 22 g; n = 5). Foram injetados 20 µL de uma solução estéril de NaCl 0,85% contendo 10 µg de Asp-49 ou Lys-49 PLA<sub>2</sub>, previamente incubados por 30 min com 20 µg de BoαPLI. A pata contralateral foi injetada com o mesmo volume de solução estéril de NaCl 0,85%. Os grupos-controle foram inoculados com 20 µg de BoαPLI, 20 µL de NaCl 0,85% ou 10 µg de Asp-49 ou Lys-49, com volume final de 20 µL. A espessura da pata foi medida usando um paquímetro digital com precisão de 0,01 mm nos tempos: 0; 0,5; 1; 2; 4; 6 e 24 h após injeção. Os resultados foram expressos como a diferença na espessura de ambas as patas e representados como o aumento percentual na espessura da pata.

### 2.3.12.3 Atividade miotóxica.

A inibição da miotoxicidade pelo BoαPLI foi determinada de acordo com BELCHOR et al., (2017), através injeção de 40 µL de Asp-49 ou Lys-49 PLA<sub>2</sub> (10 µg) incubados por 30 min com BoαPLI (20 µg) no músculo *gastrocnemius* direito de camundongos Swiss machos (18 a 22 g, n = 5) Os grupos controle receberam 20 µg de PLA<sub>2</sub> Asp-49 ou Lys-49 ou 20 µg de BoαPLI, com o mesmo volume de injeção ou 40 µL de solução estéril de NaCl 0,85%. Amostras de sangue de camundongos foram coletadas da ponta da cauda (SALVADOR et al., 2019) em tubos contendo citrato de trissódico (3,8%) como anticoagulante. O plasma foi obtido após centrifugação a 1200 x g por 15 minutos. A quantidade de creatina quinase (CK) presente nas amostras foi estimada com um kit comercial de CK (Sigma), de acordo com as instruções do fabricante.

### 2.3.13 Tromboelastometria

#### 2.3.13.1 Obtenção de plasma citratado de galinha

Para avaliar a capacidade de inibição do potencial anticoagulante da crotoxina pelo BoαPLI foi realizado o ensaio de tromboelastometria. Galinhas adultas (White leghorn), foram submetidas à contenção mecânica, e a região acima da veia braquial submetida a anestesia local com spray de Xylocaina. 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%. O plasma de galinha foi obtido após centrifugação a 3000 x g durante 20 min a 4 ° C.

### 2.3.13.2 Teste de coagulação

A crotoxina possui atividade anticoagulante, que pode ser avaliada através de vários ensaios *in vitro*, inclusive através da tromboelastometria rotacional (ROTEM - Pentapharm, Munich, Germany) (WHITING; DINARDO, 2014; PREZOTO; OGUIURA, 2020). A possível atividade inibitória do Bo $\gamma$ PLI sobre a atividade anticoagulante da crotoxina foi avaliada através de ensaios de coagulação através dessa tecnologia (PREZOTO; OGUIURA, 2020). O parâmetro tempo de coagulação (TC) do perfil ROTEM foi avaliado em um sistema ROTEM® de quatro canais (Pentapharm, Munich, Germany) 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 (GE). No GE1, a 260  $\mu$ L de plasma de galinha foram adicionados 20  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> (0,2M) e 60  $\mu$ L de PBS, perfazendo um volume final de 340  $\mu$ L. Neste grupo experimental, o TC de coagulação é relativamente prolongado, durando no mínimo 1800 segundos até o surgimento espontâneo de coágulos. Este valor foi considerado como porcentagem mínima de coagulação (ou 0%) para a realização dos cálculos estatísticos. No GE2, doses crescentes de um reagente ativador da via intrínseca da coagulação (aPTT clot, contendo ácido elágico e fosfolídeos sintéticos, da BIOS Diagnostica, SP, Brasil) foram incluídos na fração de 60  $\mu$ L de PBS, para padronização da dose efetiva média do ativador capaz de reduzir o parâmetro TC para um valor próximo a 900 segundos (região média da curva dose-resposta). No GE3, à dose padronizada do ativador, foram adicionados 100 ng de crotoxina, suficiente para prolongar o parâmetro TC para no mínimo 1800 segundos. No GE4, 100 ng de crotoxin previamente incubados (por 1 min) com 500 ng de PLI foram ensaiados para detecção de possível atividade inibitória sobre a atividade anticoagulante da crotoxina. E finalmente, no GE5 a possível atividade do PLI foi também avaliada para detecção de possível interferência sobre o sistema hemostático.

### 2.3.14 Análises estatísticas

Os ensaios de inibição enzimática (fator= consumo do substrato, níveis= Controle negativo, Asp-49 PLA<sub>2</sub>, Bo $\gamma$ PLI e Bo $\gamma$ PLI incubado com Asp-49 PLA<sub>2</sub>) e miotoxicidade (fator= nível de CK; níveis= Controle negativo, Asp-49 ou Lys-49 PLA<sub>2</sub>, Bo $\gamma$ PLI e Bo $\gamma$ PLI incubado com Asp-49 ou Lys-49 PLA<sub>2</sub>) foram analisados com ANOVA de uma via, com Tukey como teste *a posteriori*, enquanto o teste edematogênico (fatores= tempo e porcentagem de

edema nos diferentes tratamentos) foi analisado com ANOVA de duas vias, com Tukey como teste *a posteriori*. A inibição da atividade do edema também foi especificada área sob a curva. Em relação ao ensaio de tromboelastometria, os tempos de coagulação foram comparados ao controle positivo (crotoxina) através de ANOVA de uma via com Dunnet como teste *a posteriori*. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

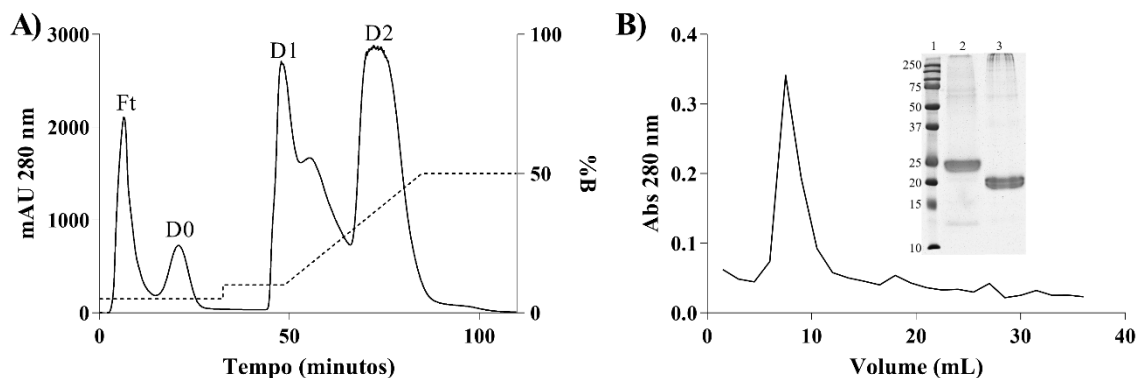


## 2.4 RESULTADOS

### 2.4.1 Purificação

O isolamento do inibidor BoayPLI foi realizado em dois passos cromatográficos, sendo eles: cromatografia de troca iônica e cromatografia de afinidade. A primeira cromatografia em coluna DEAE Hi Trap 5 mL (GE Healthcare), resultou em três frações, sendo a fração D2 selecionada para prosseguimento da purificação (Figura 2.1A). A fração D2, após diálise, foi aplicada em coluna de afinidade com resina *CNBr-activated Sepharose* (GE Healthcare), na qual havia sido previamente imobilizada a crotoxina. O PLI foi eluído com glicina 0,1 M pH 2,7 e a eluição foi monitorada manualmente a 280 nm (Figura 2.1B).

**Figura 2.1 A)** Fracionamento do soro de *Boa constrictor*. Cromatografia de troca iônica em coluna HiTrap DEAE 5 mL com tampão A (Tris 25 mM pH 7,5) e tampão B (Tris 25 mM NaCl 1 M, pH 7,5), fluxo de 1 mL/min. Cinco mL de soro diluído em tampão A foram aplicados na cromatografia, que teve início a 5% de B, seguidos por um step a 10% de B e então um gradiente de 10% a 50% de B. Foram evidenciadas três frações resultantes: D0, D1 e D2. **B)** Eluição da fração contendo o BoayPLI, após a fração D2 ser aplicada em cromatografia de afinidade com crotoxina acoplada em resina *CNBr-activated Sepharose* (GE Healthcare). A eluição foi realizada com glicina 0,1 M, pH 2,7, o pH foi neutralizado com a adição de Tris 1 M pH 8,8. A eluição foi dosada manualmente a 280 nm. **Inserto)** SDS-PAGE 12 % do inibidor em condições redutoras (2) ou não redutoras (3). (1) Marcador molecular Dual color (Biorad).



A porcentagem de recuperação do PLI após os dois passos cromatográficos foi de 0,63% (Tabela 2.1). A dosagem do *flow through* foi realizada em batelada, resultando em 25,2 mg.

Não foi realizado o acompanhamento da atividade específica do inibidor pois o soro mascarou a atividade inibitória da proteína, uma vez que o soro possui PLA<sub>2</sub>s endógenas.

**Tabela 2.1** Tabela de purificação do PLI de *Boa constrictor*

	mg totais	% de recuperação
Soro Inicial	125,15	-
Fração D2	57,81	46,19%
Eluato (PLI)	0,80	0,63%

#### 2.4.2 Caracterização Biofísica

##### 2.4.2.1 Caracterização da estrutura primária - SDS-PAGE

A partir da purificação foi iniciada a caracterização estrutural do PLI a partir de SDS-PAGE, 12%, que apresentou uma banda a 25 kDa, em condições redutoras, e 20 kDa, em condições não redutoras (Figura 2.1, inserto), bem como, uma banda a ~70 kDa. A banda observada a partir da eluição do PLI, em condições redutoras, foi excisada e enviada para análise de espectrometria de massas, para averiguação da pureza e resolução de sua estrutura primária parcial.

##### 2.4.2.2 Caracterização da estrutura primária – Espectrometria de massas

A sequência parcial do inibidor foi identificada, apresentando 58% e 30% de similaridade com as duas subunidades de PLI $\gamma$  de *Lachesis muta muta*, 30% com o PLI de *Crotalus durissus terrificus*, 32% de cobertura com *G. brevicaudus siniticus*, e 17% com *Protobothrops flavoridis* e *Elaphe quadrivirgata*, sendo a última uma serpente não peçonhenta (Tabela 2.2). Ademais, sequência do PLI $\gamma$  de *Lachesis muta muta* foi identificada através de seu transcrito (FORTES-DIAS; BARCELLOS; ESTEVÃO-COSTA, 2003), possuindo seu peptídeo sinal de 19 aminoácidos, que é ausente em uma proteína purificada de plasma. Desconsiderando o peptídeo sinal, a homologia aumenta de 58% para 64%.

A identificação da estrutura primária do inibidor por espectrometria de massas permitiu classificá-lo como um PLI $\gamma$ , com alta conservação de sequência, sobretudo com o inibidor de *Lachesis muta muta* (FORTES-DIAS; BARCELLOS; ESTEVÃO-COSTA, 2003). O inibidor da serpente não peçonhenta *Elaphe quadrivirgata* também apresentou semelhanças de estrutura primária, tendo algumas substituições de aminoácidos. Em razão da semelhança em estrutura com outros PLI $\gamma$ s, o PLI foi denominado Boa $\gamma$ PLI.

Em paralelo ao presente trabalho, foi identificado por transcriptoma um inibidor endógeno do tipo PLI $\gamma$  na serpente *Boa constrictor*. Alinhando as sequências identificadas por massas com a identificada por transcriptoma, é possível observar a total homologia, corroborando Bo $\gamma$ PLI como um inibidor endógeno do tipo PLI $\gamma$  (FORTES-DIAS et al., 2020) (Figure 2.2). Ademais, assim como no presente trabalho, semelhanças com o CNF, inibidor de *Crotalus durissus terrificus*, também foram identificadas.

**Tabela 2.2** Proteínas identificadas com maior porcentagem da cobertura a partir dos peptídeos obtidos da banda retirada do SDS-PAGE (Figura 2.1B, inserida) e analisadas por espectrometria de massas.

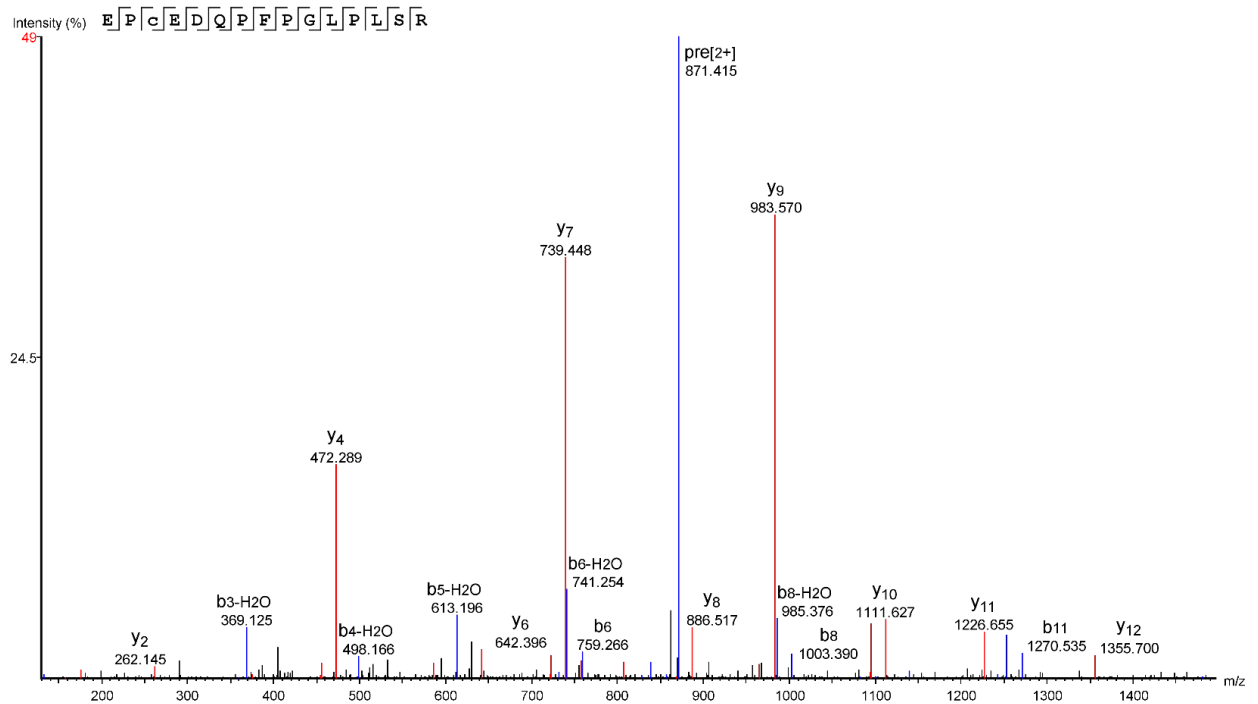
Número de acesso	Cobertura (%)	Peptídeos	Peptídeos únicos	Massa (Da)	Descrição
P60592	58	30	17	22207	Phospholipase A2 inhibitor LNF2 OS= <i>Lachesis muta muta</i>
P60591	30	12	2	22235	Phospholipase A2 inhibitor LNF1 OS= <i>Lachesis muta muta</i>
Q90358	30	12	2	22267	Phospholipase A2 inhibitor CNF OS= <i>C. durissus terrificus</i>
P82143	32	11	11	22232	Phospholipase A2 inhibitor subunit $\gamma$ B OS= <i>G. b.siniticus</i>
O57690	17	9	3	22395	Phospholipase A2 inhibitor 1 OS= <i>Protobothrops flavoviridis</i>
Q9PWI4	17	7	3	22547	Phospholipase A2 inhibitor subunit $\gamma$ A OS= <i>E. quadrivirgata</i>

**Figure 2.2** Alinhamento da sequência parcial do PLI de *Boa constrictor* (Bo $\gamma$ PLI) com o inibidor BcNF, identificado por transcriptoma do fígado da serpente *Boa constrictor*. A cor azul representa aminoácidos hidrofóbicos, a vermelha os que possuem carga positiva, a magenta: carga negativa, a verde: aminoácidos polares, a rosa claro: cisteínas, a laranja: glicinas, a amarela: prolinas, a azul turquesa: aminoácidos aromáticos, sequências não conservadas ou que não foram identificadas no massas não estão coloridas. Padrão de cor Clustal Ômega.

Bo $\gamma$ PLI	-----DCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSVR----NCFSSSICKLGQID	45
BcNF	RSCDFCHNIGKDCDGYEQECSSPEDVCGKVFLEISSASLSVRTVHKNCFSSSICKLGQID	60
	*****	
Bo $\gamma$ PLI	VNIGHHSYIRGRVNCCEKEPCEDQFPFGLPLSR-----GLFTEDSTEYEAIChGT	95
BcNF	VNIGHHSYIRGRVNCCEKEPCEDQFPFGLPLSRPNGYCPGALGLFTEDSTEYEAIChGT	120
	*****	
Bo $\gamma$ PLI	ETKcINIVGHR-----GCVSSCPLLSL-----	117
BcNF	ETKcINIVGHRyENFPgDITyNLKGCvSSCPLLSLSNATREQRNYLQkVECKDAIRLASL	180
	*****	

Estudos anteriores sugeriram que o oligopeptídeo <sup>104</sup>QFPFGLPLSRPN<sup>118</sup> está relacionado com o sítio de interação entre PLI $\gamma$ s e PLA<sub>2</sub>s em *Bothrops* sp (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008) e essa sequência de aminoácidos foi parcialmente identificada no Bo $\gamma$ PLI, o que reitera sua classificação como PLI $\gamma$  (sequencia parcial desse peptídeo mostrado na Figura 2.3).

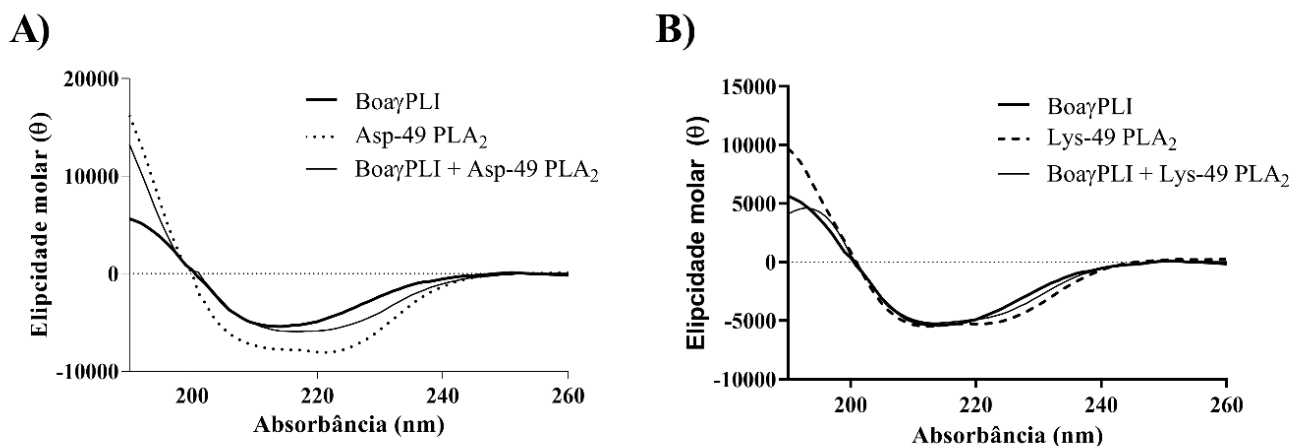
**Figura 2.3** Espectro de MS / MS anotado do peptídeo triptico “EPCEDQPFPLPLSR” do BoayPLI. O peptídeo foi detectado em  $m/z$  871.42<sup>+2</sup>e identificado pela pesquisa no banco de dados PEAKS Studio 7.5.



#### 2.4.2.3 Dicroísmo circular

A estrutura secundária do BoayPLI foi investigada por dicroísmo circular, apresentando 21,4% de alfa-hélices, 39,4% de folhas beta e 38,7% de estruturas desordenadas, aproximadamente. Em comparação, a PLA<sub>2</sub> apresentou 26,9% de alfa-hélices e 34,9% de estruturas desordenadas. A incubação das duas proteínas não alterou de forma significativa o espectro de dicroísmo em comparação com o inibidor isolado, sugerindo uma interação não covalente (Figura 2.4; Tabela 2.3).

**Figura 2.4** Espectros obtidos por dicroísmo circular em comprimentos de onda entre 190 e 260 nm. Os dados foram expressos em Elipcidade Molar. A partir de seu espectro, foi possível estimar o teor da estrutura secundária das proteínas em questão. A) Bo $\gamma$ PLI e Asp-49 PLA<sub>2</sub> isolados e incubados (30  $\mu$ g) B) Bo $\gamma$ PLI e Lys-49 PLA<sub>2</sub> isolados e incubados (30  $\mu$ g).



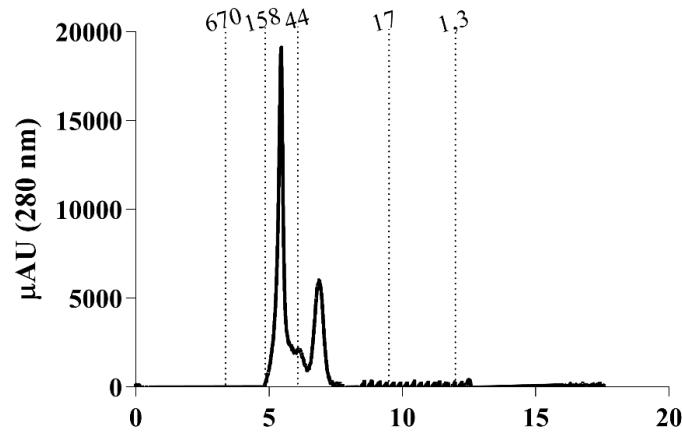
**Tabela 2.3** Porcentagens aproximadas de estruturas secundárias do inibidor isolado (Bo $\gamma$ PLI), Asp-49 / Lys-49 PLA<sub>2</sub> e Bo $\gamma$ PLI isolados e incubados calculadas a partir do espectro de dicroísmo circular.

	Bo $\gamma$ PLI	Asp -49 PLA <sub>2</sub>	Bo $\gamma$ PLI + Asp-49 PLA <sub>2</sub>	Lys-49 PLA <sub>2</sub>	Bo $\gamma$ PLI + Lys-49 PLA <sub>2</sub>
Alfa-hélices	21,4 %	26,9 %	23,1 %	24,5%	24,1%
Antiparalelas	28,2 %	16,3 %	22,3 %	20,1%	20,2%
Paralelas	11,2 %	9,6 %	10,9 %	10,4%	10,5%
Beta-Turn	19,6 %	18,2 %	18,9 %	18,7%	18,7%
Estruturas desordenadas	38,7 %	34,9 %	38,8 %	37,3%	37,9%
Total	119,2 %	105,9 %	114,1 %	111,0%	111,4%

#### 2.4.2.4 Oligomerização – Cromatografia de exclusão molecular

Para análise de possíveis oligômeros, uma cromatografia de exclusão molecular BioSep SEC 2000 (Phenomenex) foi realizada, com o inibidor isolado (Figura 2.5).

**Figura 2.5** Cromatografia de exclusão molecular em coluna BioSep SEC 2000 do inibidor Bo $\alpha$ PLI (20  $\mu$ g). A corrida foi realizada com Tris HCl 0,05 M, NaCl 0,05 M, pH 8, com fluxo de 1 mL / min e detecção em 280 nm. Valores superiores são relacionados ao tempo de retenção do padrão de massa molecular Gel Filtration Standart (BioRad).



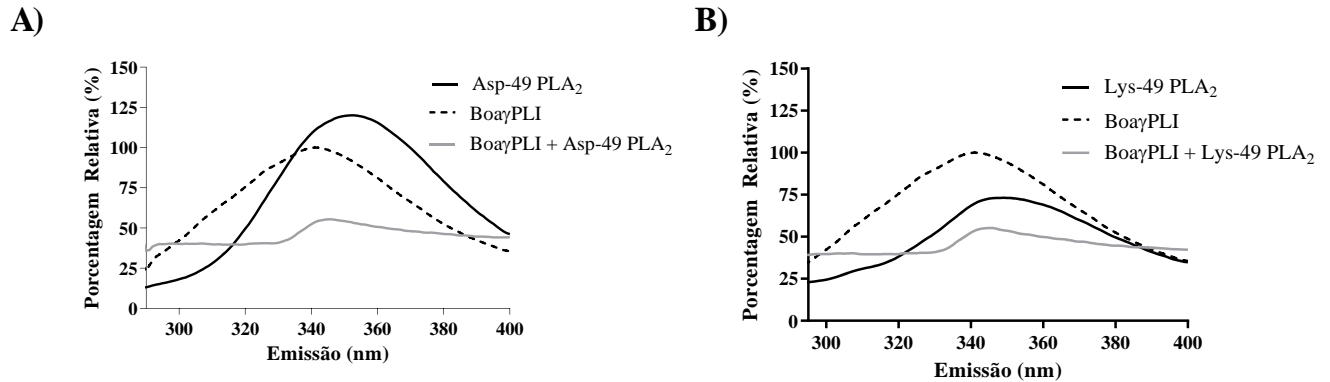
É possível observar dois picos no cromatograma do inibidor isolado, corroborando a presença de oligômeros e monômeros (Figura 2.5).

### 2.4.3 Caracterização interação com as PLA<sub>2</sub>s

#### 2.4.3.1 DSF – análise de fluorescência de varredura

Os resultados obtidos no dicroísmo circular sugerem uma interação não covalente e que provavelmente envolva aminoácidos aromáticos como o triptofano, fenilalanina ou tirosina. A varredura da fluorescência intrínseca das amostras, ocorreu com excitação em 280 nm, seguido de um monitoramento da emissão entre 300 e 400 nm (Figura 2.6).

**Figura 2.6** Espectro de emissão de fluorescência entre os comprimentos de onda 300 nm a 400 nm com excitação a 280 nm de **A)** Asp-49 PLA<sub>2</sub> e **B)** Lys-49 PLA<sub>2</sub> isoladas, Bo $\gamma$ PLI isolado e incubados (30  $\mu$ g). Os dados foram expressos em porcentagem relativa, com o valor máximo do tratamento Bo $\gamma$ PLI como 100%. Todos os valores foram subtraídos do espectro do branco (NaCl 0,9%).

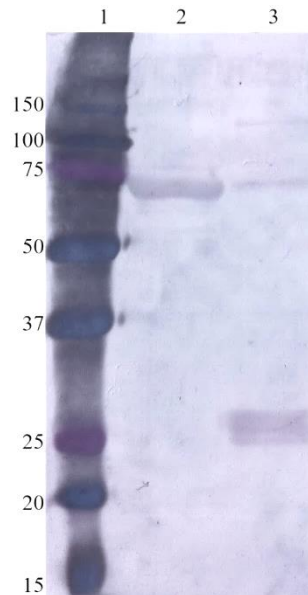


Os picos das emissões ( $\lambda_{\text{máx}}$ ) ocorreram em 341 nm (Bo $\gamma$ PLI), 353 nm (PLA<sub>2</sub>) e 345 nm (incubado), o último apresentando um  $\lambda_{\text{máx}}$  intermediário entre as duas proteínas livres, tendo uma migração de 4 nm em relação ao pico do inibidor. Uma diminuição de sua intensidade relativa também foi observada, uma oclusão dos aminoácidos como triptofano e tirosina presentes nas proteínas quando incubadas. Ademais, apesar de diferenças entre as intensidades relativas das isoformas de PLA<sub>2</sub>s, não foram observadas diferenças entre a interação com o inibidor.

#### 2.4.3.2 Imunorreconhecimento – Western blotting

Para averiguar o imunorreconhecimento do PLI pela PLA<sub>2</sub> e sua possível interação, o ensaio de *western blotting* foi realizado, no qual as amostras de soro inicial e PLI isolado, em condições redutoras, foram transferidas à membrana de PVDF, que foi incubada com PLA<sub>2</sub> isolada de *C. d. terrificus*, soro anticrotálico, e o reconhecimento foi observado pela incubação com o anticorpo secundário (IgG de cavalo conjugado com peroxidase, Sigma) (Figura 2.7).

**Figura 2.7** Imunorreconhecimento do soro inicial de *Boa constrictor* e Bo $\gamma$ PLI, sob condições redutoras. As proteínas (20  $\mu$ g) foram submetidas a SDS-PAGE 12% e transferidas à membrana de PVDF, que foi incubada inicialmente com PLA<sub>2</sub> de *C. d. terrificus* (2  $\mu$ g) e, posteriormente, com o soro anticrotático como anticorpo primário, e, finalmente, com o IgG de cavalo conjugado com peroxidase como anticorpo secundário. A revelação foi realizada com DAB e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>. 1. Marcador de massa molecular BioRad Dual color (kDa); 2. Soro de *Boa constrictor*; 3. Bo $\gamma$ PLI.



É possível observar o reconhecimento do inibidor em aproximadamente 25 kDa. A fração de soro total possui um reconhecimento fraco na faixa de 25 kDa. O imunorreconhecimento do PLI quando sensibilizado com PLA<sub>2</sub> foi demonstrado por *western blotting*, em que, em condições redutoras, houve uma banda fortemente reconhecida ao redor de 25 kDa, corroborando com a massa monomérica do Bo $\gamma$ PLI. Intrigantemente, com o soro inicial, as bandas em massas superiores tiveram um reconhecimento mais proeminente comparado à 25 kDa. Tal resultado sugere uma interação direta do PLI com a PLA<sub>2</sub>.

#### 2.4.4 Caracterização funcional

##### 2.4.4.1 Ensaio enzimático

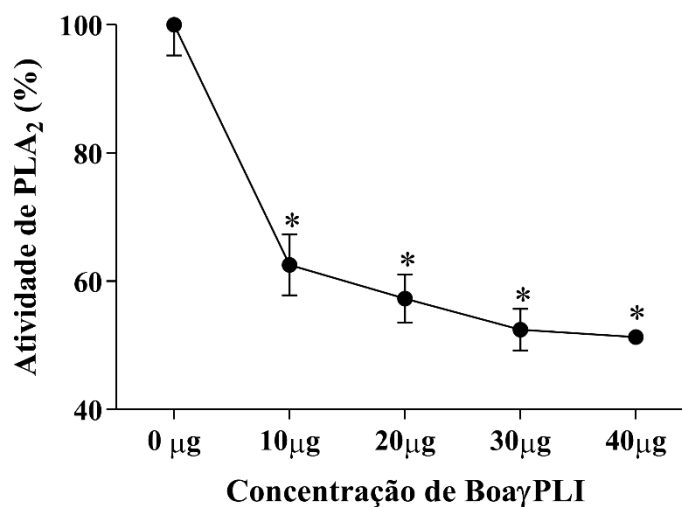
A partir da possível interação entre Bo $\gamma$ PLI e PLA<sub>2</sub> evidenciado pelo *western blotting*, um ensaio de inibição da atividade enzimática da Asp-49 PLA<sub>2</sub> foi realizado, cuja clivagem do substrato sintético NOB foi monitorada em espectrofotômetro a 425 nm (Figura 2.8). É importante pontuar que o ensaio de inibição enzimática foi realizado apenas com a Asp-49 PLA<sub>2</sub>, uma vez que a substituição do resíduo de aminoácido na posição 49 por lisina (Lys-49)



resulta na perda de atividade enzimática, apesar de ações farmacológicas como miotoxicidade ainda serem exercidos por tal isoforma (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

O teste de inibição da atividade enzimática resultou em uma inibição dose-dependente, com ~48% de inibição quando foi utilizado 40  $\mu\text{g}$  de inibidor (proporção 2:1) e ~40% com 20  $\mu\text{g}$  de inibidor. As porcentagens de inibição foram significativamente distintas quando comparadas à PLA<sub>2</sub> isolada (ANOVA de uma via (F=113.8; Df= 2, p<0,0001) com Tukey como teste *a posteriori*, p<0,05).

**Figura 2.8** Inibição da atividade enzimática da PLA<sub>2</sub> de *C. d. terrificus* por diferentes concentrações de Boa $\gamma$ PLI com o substrato sintético NOB. As amostras foram monitoradas a 425 nm, por 90 minutos, com intervalos de leitura de 5 minutos. Os dados foram expressos como porcentagem relativa (%) em relação ao controle positivo (Asp-49 PLA<sub>2</sub>) do último ponto de leitura (90 minutos). \* representa valores significativamente diferentes em relação à PLA<sub>2</sub> (ANOVA com Tukey como teste *a posteriori*, p<0,05).



#### 2.4.4.2 Ensaios farmacológicos

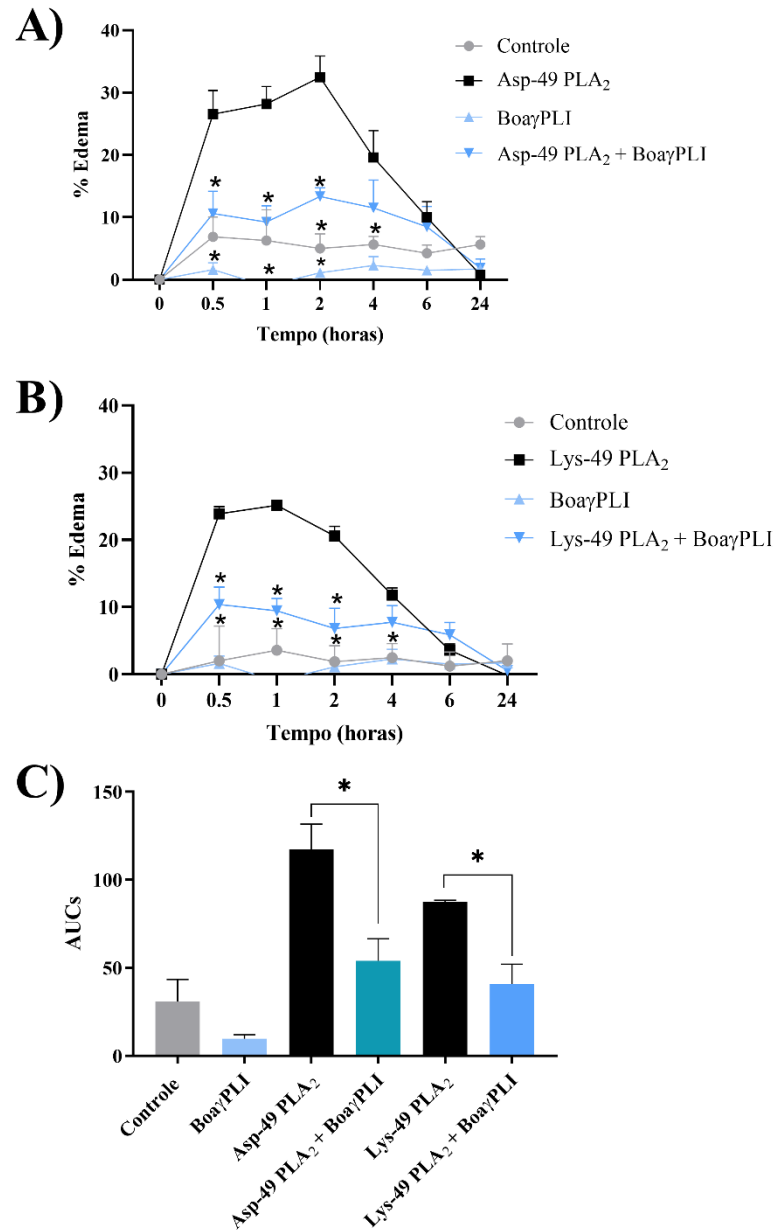
##### 2.4.4.2.1 Edema de pata e miotoxicidade

O potencial inibitório do Boa $\gamma$ PLI também foi investigado funcionalmente através de ensaio de edema de pata (Figura 2.9) e de miotoxicidade (Figura 2.10) promovidas pelas Asp-49 e Lys-49 PLA<sub>2</sub>s. Quando incubado com o inibidor, o edema foi significativamente menor

comparado às PLA<sub>2</sub>s isoladas (ANOVA de duas vias; Asp-49 PLA<sub>2</sub> (F (18, 63) = 11,29, p<0,0001); Lys-49 PLA<sub>2</sub> (F (18, 74) = 12,46, p<0,0001). A partir da confirmação do efeito entre % do edema entre os diferentes tratamentos, o teste *a posteriori* de Tukey permitiu a comparação entre quais tratamentos nos diferentes tempos possuía diferença na % de edema, sendo os valores de p<0,05 considerados como diferenças significativas (Figura 2.9).

Para destacar as diferenças entre os tratamentos, a área sob a curva também foi estimada. Como esperado, o perfil de edema induzido por PLA<sub>2</sub>s isoladas resultou em uma área sob a curva maior quando comparado aos grupos que receberam PLA<sub>2</sub>s pré-incubadas com BoγPLI (Controle: 30,90 ± 12,53; BoγPLI: 9,83 ± 2,28; Asp-49 PLA<sub>2</sub>: 117,20 ± 14,44; BoγPLI + Asp-49 PLA<sub>2</sub>: 54,11 ± 12,46; Lys- 49 PLA<sub>2</sub>: 87,53 ± 0,86; BoγPLI + Lys-49 PLA<sub>2</sub>: 40,77 ± 11,32).

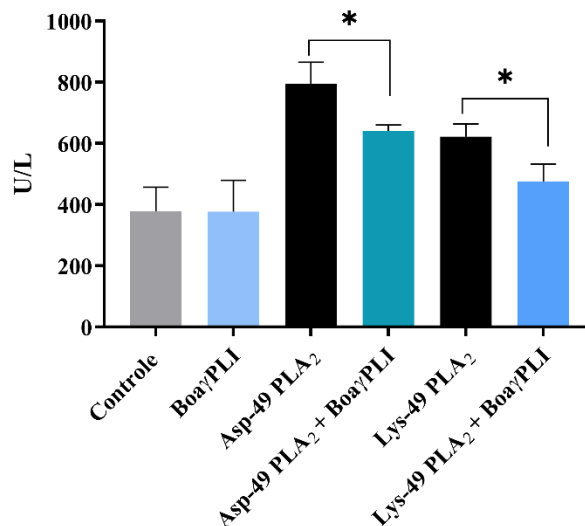
**Figura 2.9** Atividade edematogênica de Asp-49 (A) e Lys-49 PLA<sub>2</sub> (B) isoladas (10 µg) e quando incubadas previamente por 30 min com 20 µg de BoαγPLI, injetadas na região sub plantar direita da pata de camundongo (Swiss). C) Áreas sob a curva dos edemas de pata das PLA<sub>2</sub> (Lys-49 e Asp-49) isoladas e quando incubadas por 30 minutos com BoαγPLI. \* representa valores significativamente diferentes em relação à PLA<sub>2</sub> (ANOVA de uma ou duas vias com Tukey como teste *a posteriori*,  $p < 0,05$ ).



Os níveis de creatina quinase, que refletem a miotoxicidade, também foram reduzidos quando as PLA<sub>2</sub>s foram incubadas com o inibidor (ANOVA de uma via,  $F(5, 25) = 21,62$ ,  $p < 0,0001$ ). Uma vez identificado o efeito entre os níveis de CK dos diferentes tratamentos, o teste *a posteriori* de Tukey permitiu a identificação da inibição dos níveis de CK sérico pelo

Boa $\gamma$ PLI nas diferentes PLA<sub>2</sub>s. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos (Figura 2.10).

**Figura 2.10** Atividade miotóxica mensurada a partir da quantificação de creatina quinase sérica (U/L) de Asp-49 e Lys-49 PLA<sub>2</sub>s isoladas e quando incubadas previamente por 30 min com 20  $\mu$ g de Boa $\gamma$ PLI, injetadas no músculo gastrocnêmio de camundongos (Swiss). \* representa diferenças estatísticas quando comparado às PLA<sub>2</sub>s. ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori*.



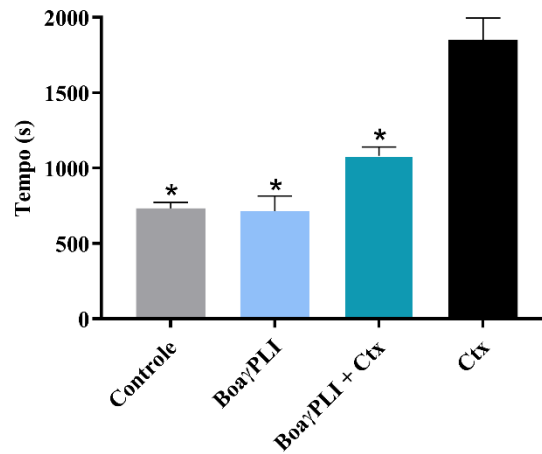
O Boa $\gamma$ PLI foi eficaz na inibição da miotoxicidade evidenciada pelos níveis de CK sérico em ambas as PLA<sub>2</sub>s testadas. É válido pontuar que nenhuma diferença de afinidade entre o PLI e as diferentes PLA<sub>2</sub>s foram identificados, sendo então o potencial inibitório do Boa $\gamma$ PLI semelhante em ambas as isoformas.

#### 2.4.4.3 Inibição da atividade anticoagulante

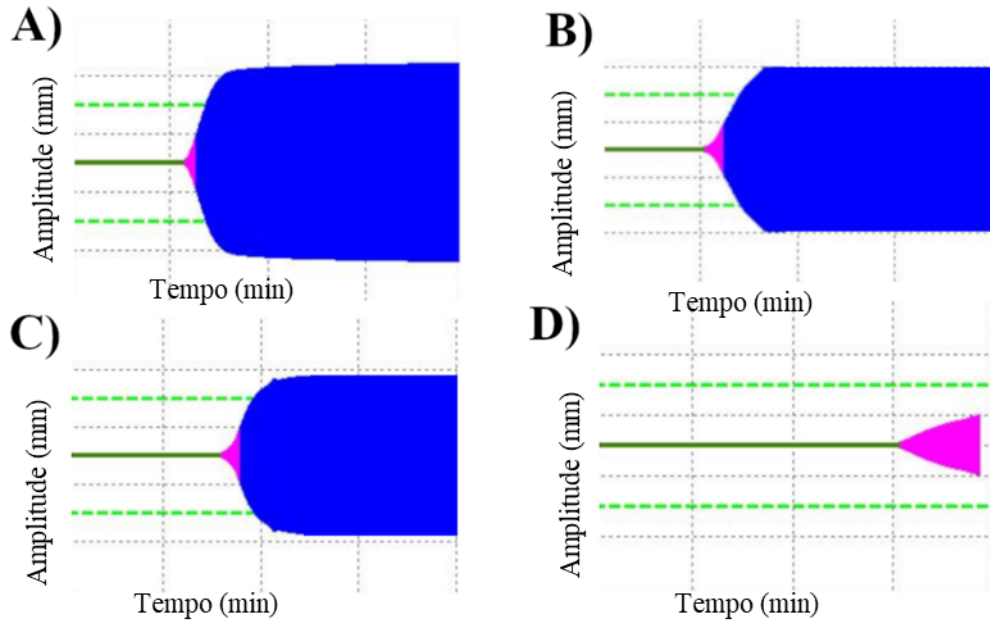
A inibição da atividade anticoagulante da crotovina também foi investigada através da técnica de tromboelastometria (Figura 2.11 e Figura 2.12). Primeiramente, o plasma de galinha foi ativado com ácido elágico. O tempo de coagulação foi de  $733,3 \pm 39,63$  s. A crotovina a 100 ng prolongou a coagulação do plasma, tendo um tempo de coagulação a  $1851,67 \pm 144,25$  s. Quando houve a incubação com a crotovina e o Boa $\gamma$ PLI, o tempo de coagulação foi a  $1083 \pm 57,49$  s, evidenciando o potencial inibitório da atividade anticoagulante da crotovina pelo inibidor. Por outro lado, quando utilizado isolado, o inibidor não alterou o tempo de coagulação em comparação com o tratamento controle ( $716,33 \pm 99,7$  s). A análise estatística demonstrou efeito do tempo de coagulação nos diferentes tratamentos (ANOVA de uma via,  $F(3, 8) = 24,24$ ,  $p = 0,0002$ ). Portanto, foi utilizado Tukey como teste *a posteriori* para investigar onde

houve diferenças significativas nos tempos de coagulação entre os tratamentos, considerando uma significância de  $p < 0,05$ .

**Figura 2.11** Tempo de coagulação (TC) do ensaio INTEM de plasma de galinha quando ativado com ácido elágico (**Controle**), incubado com 500 ng de Bo $\alpha$ PLI (**Bo $\alpha$ PLI**), com 100 ng de crotoxina (**Ctx**) e incubado com Bo $\alpha$ PLI (500 ng) e crotoxina (100 ng) (**Bo $\alpha$ PLI + Ctx**). N= 4, ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori*. \* representa valores significativamente diferentes em relação à crotoxina ( $p < 0,05$ ).



**Figura 2.12** Perfil tromboelastométrico do ensaio INTEM por ácido elágico (A), quando ativada e incubada com o inibidor Bo $\gamma$ PLI (500 ng) (B), incubada com inibidor Bo $\gamma$ PLI (500 ng) e crotoxina (100 ng) (C) e incubada com a crotoxina (100 ng) (D). Eixo X = Tempo (segundos); eixo Y = Amplitude (milímetros).



## 2.5 DISCUSSÃO

O presente trabalho apresenta o isolamento e a caracterização estrutural e funcional do BoayPLI, inibidor de PLA<sub>2</sub> proveniente do soro de *Boa constrictor*, uma serpente não peçonhenta que habita o território brasileiro.

Apesar do isolamento de inúmeros PLIs de serpentes peçonhentas (CAMPOS et al., 2016; FORTES-DIAS et al., 2016), apenas alguns inibidores foram isolados de serpentes não peçonhentas (THWIN et al., 2002; SHIRAI et al., 2009), que torna instigante este tipo de estudo, sugerindo que a presença de PLIs não se restringe somente à hipótese principal, que seria a proteção contra o autoenvenenamento (SANTOS-FILHO; SILVEIRA; BOLDRINI-FRANÇA, 2015), podendo estar relacionado, entre outros fatores, ao sistema imune inato (GIBBS et al., 2020).

O processo de purificação do BoayPLI apresentou 0,63% de recuperação. O valor foi superior à porcentagem de recuperação do inibidor de *Python reticulatus*, uma serpente também não peçonhenta, que foi 0,25% (THWIN et al., 2000). O processo de obtenção deste PLI envolveu precipitações e três passos cromatográficos, portanto a diferença metodológica pode justificar a variação na recuperação do inibidor.

Em comparação à purificação do PLI $\gamma$  de *B. jararaca*, realizado com a mesma metodologia empregada pelo presente trabalho, que apresentou 1% de recuperação (SERINO-SILVA et al., 2018), o rendimento foi inferior. No entanto, sob diferentes abordagens metodológicas, o PLI $\gamma$  de *C. d. collilineatus* apresentou 2,69% de recuperação (GIMENES et al., 2014). A maior recuperação de PLIs isolados a partir de plasma de serpentes peçonhentas pode ter relação com o constante contato com o veneno desses animais, em contraste com as serpentes não peçonhentas, o que pode estimular a presença dos inibidores no plasma (KINKAWA et al., 2010). Ademais, variações na composição do veneno como atividade e porcentagem relativa de PLA<sub>2</sub> poderia alterar a quantidade de inibidores presentes no plasma.

Uma diferença na porcentagem de recuperação entre duas serpentes não peçonhentas do mesmo gênero (*Elaphe quadrivirgata* e *E. climacophora*) foi observada, bem como variação na porcentagem em seu potencial inibitório, o que foi relacionado a seus hábitos alimentares, uma vez que a *E. quadrivirgata* pode ser ofiófaga, o que resultaria em um contato indireto com veneno, tendo então seus inibidores regulados positivamente (SHIRAI et al., 2009).

O SDS-PAGE apresentou uma banda de massa molecular de 25 kDa, em condições redutoras, e de 20 kDa, em condições não redutoras. Os PLIs podem formar oligômeros, e dados na literatura sugerem uma monomerização quando os inibidores entram em contato com a PLA<sub>2</sub> (OLIVEIRA et al., 2011). Desta forma, uma vez que a cromatografia de afinidade possui crotoxina acoplada na resina, o contato da fração D2 com PLA<sub>2</sub> provavelmente monomeriza o inibidor. Portanto, a presença de uma única banda com massa molecular próxima ao monômero no SDS-PAGE era esperada.

Além disso, migração diferenciada do Boa $\gamma$ PLI, em condições redutoras, em que apresenta uma massa molecular superior do que em condições não redutoras, pode estar relacionada à interações moleculares particulares de PLIs. OLIVEIRA et al., (2011) sugerem que as interações moleculares do PLI, como ligações não covalentes e pontes dissulfeto, facilitam a migração em condições não redutoras. Quando a molécula é linearizada, por sua vez, ocorre uma migração mais lenta. Ademais, o mesmo fenômeno foi observado no PLI $\gamma$  de *B. jararaca* (SERINO-SILVA et al., 2018).

Apesar do SDS-PAGE ter identificado uma banda de 25 kDa, os peptídeos identificados com maior homologia foram subunidades do PLI de *Lachesis muta muta*, uma proteína hetero-oligomérica (FORTES-DIAS; BARCELLOS; ESTEVÃO-COSTA, 2003). Apesar de hetero-oligomérica, a sequência das subunidades é bem conservada, explicando o resultado encontrado por espectrometria de massas. Além disso, a sequência do PLI $\gamma$  de *Lachesis muta muta* foi identificada através de seu transcrito (FORTES-DIAS; BARCELLOS; ESTEVÃO-COSTA, 2003), possuindo seu peptídeo sinal de 19 aminoácidos, que é ausente em uma proteína purificada de plasma. Desconsiderando o peptídeo sinal, a homologia é de 64%. Ademais, o alinhamento com o PLI de *Boa constrictor* identificado por transcriptoma demonstrou 100% de cobertura (FORTES-DIAS et al., 2020).

De acordo com a árvore filogenética discutida por FORTES-DIAS; BARCELLOS; ESTEVÃO-COSTA, (2003), somado ao alinhamento obtido, o Boa $\gamma$ PLI está inserido ao subgrupo de PLI $\gamma$ s hetero-oligoméricos juntamente com *Lachesis muta* e *C. d. terrificus*.

O oligopeptídeo <sup>104</sup>QPFPGGLPLSRPNGYY<sup>118</sup> foi sugerido como sítio de interação entre PLI $\gamma$ s e PLA<sub>2</sub>s em *Bothrops* sp (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008) e essa sequência de aminoácidos foi parcialmente identificada no Boa $\gamma$ PLI. Além disso, reforça a estrutura primária



conservada desses inibidores. As espécies *Glodyus sp.* e *Elaphe quadrivirgata* não possuem essa sequência proposta, enquanto a subunidade 1 do PLI de *Lachesis muta* e o PLI de *Protobothrops sp.* possuem uma substituição no segundo aminoácido do oligopeptídeo ( $P \rightarrow L$  e  $P \rightarrow S$ , respectivamente). Alguns autores sugerem ainda que pode haver três sítios de fosforilação, na posição  $^{21}S$ ,  $^{22}S$  e  $^{111}T$ , e que esses sítios podem estar envolvidos em outros papéis fisiológicos além da inativação da  $PLA_2$ , o que reforçaria a hipótese sobre a presença de PLIs no plasma de serpentes não peçonhentas. No entanto, até o momento, nenhum outro papel foi atribuído aos PLIs (ESTEVÃO-COSTA et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2011; SERINO-SILVA et al., 2018).

Em relação à sua estrutura secundária, o PLI de *B. constrictor* apresentou semelhanças com o PLI isolado de *B. jararaca*  $\gamma B_j$ PLI (SERINO-SILVA et al., 2018). Um outro fator interessante foi que a incubação com a  $PLA_2$  não alterou significativamente o espectro mostrado no dicroísmo circular, o que também foi evidenciado nas caracterizações do  $\gamma Cdc$ PLI e  $\gamma B_j$ jussuMIP (OLIVEIRA et al., 2011; GIMENES et al., 2014). Tal fato sugere uma interação fraca do  $Boa\gamma$ PLI com sua molécula-alvo. O inibidor purificado de *Macropisthodon rudis* também apresentou características de ligação não covalente, evidenciado por SDS-PAGE do  $Boa\gamma$ PLI e incubado com a  $PLA_2$ , em condições não redutoras (ZHONG; HUANG, 2016).

As análises cromatográficas de exclusão molecular mostraram dois picos no  $Boa\gamma$ PLI isolado, sugerindo a oligomerização da molécula. OLIVEIRA et al., (2011) mostrou apenas o oligômero na exclusão molecular do  $\gamma B_j$ jussuMIP, bem como o PLI $\gamma$  purificado de *Macropisthodon rudis* (ZHONG; HUANG, 2016). Em contraste, o  $\gamma B_j$ PLI foi encontrado apenas na forma de monômero. Ademais, foi evidenciada a interação do PLI com a  $PLA_2$ . (SERINO-SILVA et al., 2018). Por outro lado, o PLI $\gamma$  homólogo isolado de *Python sabae* também apresentou oligômeros e monômeros em seu espectro (DONNINI et al., 2011).

Uma diminuição de sua intensidade relativa da fluorescência também foi observada quando o inibidor foi incubado com as  $PLA_2$ s, o que reitera a hipótese da oclusão de aminoácidos aromáticos como triptofano e tirosina quando inibidor e  $PLA_2$ s são incubados. Um padrão semelhante foi observado com  $\gamma B_j$ jussuMIP, porém a interação só foi observada ao somar as intensidades relativas do  $Boa\gamma$ PLI e da  $PLA_2$  isolados (OLIVEIRA et al., 2011). Ademais, apesar de diferenças entre as intensidades relativas das isoformas de  $PLA_2$ s, não foram observadas diferenças entre a interação com o inibidor.

O ensaio de *western blotting* evidenciou a interação do Bo $\gamma$ PLI com a PLA<sub>2</sub>. O PLI $\gamma$  isolado de *Sinonatrix annularis* (SaPLI $\gamma$ ) também possuiu a capacidade de interação direta investigada por *western blotting*, em que as PLA<sub>2</sub>s encontradas no lisado de pata de camundongo foi capaz de reconhecer o SaPLI $\gamma$  (ZHANG et al., 2018).

O ensaio de inibição enzimática demonstrou a inibição da atividade catalítica da PLA<sub>2</sub> pelo Bo $\gamma$ PLI em cerca de 48% na maior concentração de inibidor utilizada. Ademais, valores de inibição semelhantes foram identificados pelo  $\gamma$ BjPLI, inibidor isolado de *B. jararaca* (SERINO-SILVA et al., 2018) e com o  $\gamma$ BjussuMIP, inibidor isolado de *B. jararacussu* (OLIVEIRA et al., 2011). Comparativamente, um inibidor homólogo ao PLI $\gamma$  de *Python sp.* mostrou uma baixa inibição da atividade enzimática de PLA<sub>2</sub> do grupo II proveniente de abelha (DONNINI et al., 2011), por sua vez, PIP, PLI $\gamma$  isolado de *Python reticulatus*, apresentou uma alta inibição (1:1 molar), chegando a 90%, medido através do método acidimétrico em gema de ovo, com PLA<sub>2</sub> de *Daboia russelli* (THWIN et al., 2000).

As atividades de edema e miotoxicidade foram avaliadas por serem ações farmacológicas características das PLA<sub>2</sub>s (Asp-49 e Lys-49), uma vez que sua atividade catalítica envolve a hidrólise de fosfolipídios, e conseqüentemente leva a indução de ácido araquidônico, promotor de atividade inflamatória característica da formação de edema (MURAKAMI et al., 2014; XIAO et al., 2017). Apesar da perda da atividade catalítica nas Lys-49 PLA<sub>2</sub>s, a ação miotóxica dessas enzimas é proeminente, sendo ocasionada por um mecanismo independente da atividade catalítica. Além disso, a ação sinérgica entre tais PLA<sub>2</sub>s também foi evidenciada (MORA-OBANDO et al., 2014; XIAO et al., 2017; BUSTILLO et al., 2019).

Outros  $\gamma$ PLIs de serpentes peçonhentas e não peçonhentas também demonstraram o potencial inibitório nas atividades farmacológicas de edema e miotoxicidade causadas pela PLA<sub>2</sub> (OLIVEIRA et al., 2011; GIMENES et al., 2014; SERINO-SILVA et al., 2018). Além disso, nossos dados não mostraram diferenças estatísticas do potencial de inibição do Bo $\gamma$ PLI em relação às PLA<sub>2</sub>s Asp-49 e Lys-49, diferentemente do  $\gamma$ BjussuMIP, que possui maior afinidade por Asp-49 PLA<sub>2</sub> (OLIVEIRA et al., 2011). Mesmo sendo uma serpente não peçonhenta, um ponto interessante do estudo corresponde às características funcionais e estruturais do Bo $\gamma$ PLI que foram bem conservadas quando comparadas com  $\gamma$ PLIs de serpentes peçonhentas.

Em relação à atividade anticoagulante da crotoxina, o Bo $\gamma$ PLI demonstrou potencial inibitório, restaurando tanto o tempo de coagulação como a força do coágulo em plasma de galinha. Diversas PLA<sub>2</sub>s de venenos apresentam atividade anticoagulante (OUYANG; TETVG; HUANG, 1992; HIGUCHI et al., 2007; SAIKIA; MUKHERJEE, 2017), incluindo a crotoxina, sendo que 100 ng desta é capaz de prolongar o tempo de coagulação (TC) do plasma de galinha ativado por ácido elálgico de forma significativa (PREZOTO et al., 2018). Quando incubado com o inibidor, o TC diminui significativamente comparado com a crotoxina isolada, evidenciando o potencial inibitório do PLI.

A inibição da atividade anticoagulante também foi investigada pelo PLI purificado de *Bothrops asper* (BaMIP) (LIZANO et al., 1997) e *Cerrophidion (Bothrops) godimani* (LIZANO et al., 2000), sendo o último demonstrado também com crotoxina, corroborando os valores encontrados no presente trabalho. SANTOS-FILHO et al., (2011) sugeriram que a inibição da atividade anticoagulante da PLA<sub>2</sub> pelo PLI de *B. alternatus* está relacionada com a atividade catalítica de clivagem de fosfolipídios, uma vez que as inibições das atividades enzimáticas e anticoagulantes foram semelhantes, resultados semelhantes aos obtidos pelo Bo $\gamma$ PLI.

Em suma, o presente capítulo demonstrou a purificação e caracterização estrutural e funcional do Bo $\gamma$ PLI, PLI de *B. constrictor*, uma serpente não peçonhenta, que possui massa molecular de aproximadamente 22 kDa, capacidade de oligomerização e estrutura primária semelhante ao PLI de *Lachesis muta*. As interações diretas de Bo $\gamma$ PLI com Asp-49 PLA<sub>2</sub> *C. d. terrificus* e Lys-49 PLA<sub>2</sub> de *Bothrops jararacussu* foram evidenciadas por difração circular, *western blotting* e ensaio de fluorescência, e a molécula apresentou inibição sobre as atividades enzimática, edematogênica, miotóxica e anticoagulante das PLA<sub>2</sub>s isoladas. Um ponto interessante deste estudo é que nossos dados acrescentam evidências que apontam a ampla distribuição desses inibidores, que aparecem em serpentes peçonhentas e não peçonhentas, e, além disso, sua estrutura e atividade inibitória parecem estar bem conservadas entre elas. Essa evidência amplia a hipótese primária para a presença de PLIs, que era a proteção contra o autoenvenenamento. Portanto, o inibidor não se restringe a essa função.

Nesse contexto, o presente estudo pode contribuir para a elucidação da presença de inibidores de PLA<sub>2</sub> em serpentes não peçonhentas e fornecer novas perspectivas para os

inibidores de PLA<sub>2</sub> de plasma de serpentes, através da caracterização e comparação entre PLI de serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

### Capítulo 3

Caracterização do potencial inibitório da atividade anticoagulante do veneno de *M. laticollaris*, serpente ofiófaga pelo Boa $\gamma$ PLI.

Esse Capítulo possui resultados publicados (RODRIGUES, CFBR; ZDENEK, CN; SERINO-SILVA, C; GREGO, KF; MORAIS-ZANI, K; BERNARD-VALLE, M; ALARGON, A; TANAKA-AZEVEDO, A; FRY, BG. Boa $\gamma$ PLI from *Boa constrictor* blood is a broad-spectrum inhibitor of venom PLA<sub>2</sub> pathophysiological actions. Journal of Chemical Ecology, 2021.)

### 3.1 INTRODUÇÃO

A coevolução entre espécies concorrentes (dinâmica da Rainha Vermelha) cria pressões de seleção que geralmente levam a inovações evolutivas. As constantes interações antagônicas modulam uma adaptação evolutiva rápida nas espécies relacionadas. Este fenômeno está relacionado a distintas interações ecológicas, como interações hospedeiro-parasita e resistência ao veneno por presas ou predadores de serpentes peçonhentas (VAN VALEN, 1973; DE WIT; WESTRÖM, 1987; FORTES-DIAS et al., 1991, 2016; BARCHAN et al., 1992, 1995; TAKACS; WILHELMSSEN; SOROTA, 2001, 2004; LIZANO; DOMONT; PERALES, 2003; DRABECK; DEAN; JANSA, 2015; ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017; KHAN et al., 2020; GIBBS et al., 2020; HARRIS; FRY, 2021; JONES; HARRIS; FRY, 2021).

A resistência ao envenenamento é um fenômeno amplamente conhecido em toda a árvore da vida. A interação entre organismos peçonhentos e seus predadores / presas pode levar a diferentes mecanismos de resistência, e essa dinâmica foi utilizada para explicar a alta variação das características ofensivas (composição do veneno) e defensivas (resistência bioquímica do veneno) (CASEWELL et al., 2013; HOLDING; BIARDI; GIBBS, 2016; ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017; GIBBS et al., 2020). A resistência ao envenenamento, por exemplo, permitiu o acesso a diferentes presas, como a predação de sapos venenosos por diversos animais resistentes a suas toxinas (UJVARI et al., 2015).

Mais especificamente, a resistência ao veneno de serpentes pode ocorrer em uma ampla gama de mecanismos. Os mecanismos mais estudados são: a inibição de toxinas-chave, em que moléculas que compõem o organismo envenenado podem se ligar e inibir as toxinas, neutralizando sua atividade; a insensibilidade ao sítio-alvo, nos quais mutações nos receptores tornam o organismo resistente; e *off-target repurposing*, em que organismos envenenados se tornam tolerantes ao efeito fisiológico das toxinas, podendo por exemplo acumulá-las, superando a toxicidade (ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017).

Alguns exemplos clássicos de resistência de cobras são a resistência à tetrodotoxina de suas presas por *off-target repurposing*, no qual as serpentes conseguem acumular a toxina sem efeitos deletérios (BRODIE et al., 2005; MCGLOTHLIN et al., 2014), e gambás e esquilos resistentes ao veneno de serpentes pela presença de inibidores de venenos (ROCHA et al., 2002; BIARDI; COSS, 2011). Outro exemplo de resistência ao envenenamento de serpentes por

insensibilidade ao sítio-alvo é a presença de mutações nos receptores nicotínicos de acetilcolina, que proporcionam resistência à neurotoxinas em suas presas (BARCHAN et al., 1992; KHAN et al., 2020; HARRIS; FRY, 2021; JONES; HARRIS; FRY, 2021).

Nesse contexto, a presença de inibidores de toxinas, cujas moléculas endógenas de organismos envenenados podem se ligar e inativar as toxinas do veneno, inibindo conseqüentemente seus efeitos farmacológicos deletérios, é um dos mecanismos de resistência de serpentes mais estudados (FORTES-DIAS et al., 2016; HOLDING; BIARDI; GIBBS, 2016; ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017).

O maior número de inibidores endógenos corresponde a inibidores de metaloproteinase e inibidores de fosfolipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) (PLIs) do plasma. Essas proteínas são capazes de inibir miotoxicidade, neurotoxicidade, inflamação aguda, anticoagulação entre outros efeitos (THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; TANAKA-AZEVEDO; TANAKA; SANO-MARTINS, 2003; SAMY et al., 2012; BASTOS et al., 2016). Em relação a seus efeitos inibitórios, apenas um pequeno número de PLIs foram avaliados quanto à inibição do efeito da anticoagulação, estando em sua maioria relacionados com a proteção contra o autoenvenenamento (OLIVEIRA et al., 2008, 2011; SANTOS-FILHO et al., 2011).

Apesar dos PLIs terem sido identificados e caracterizados em um grande número de serpentes peçonhentas (CAMPOS et al., 2016; FORTES-DIAS et al., 2016), presumivelmente como formas de auto-resistência contra seus próprios venenos, apenas um pequeno número de PLIs foi identificado em serpentes não peçonhentas (THWIN et al., 2002; SHIRAI et al., 2009; XIONG et al., 2017; FORTES-DIAS et al., 2020; RODRIGUES et al., 2020).

A hipótese subjacente à presença de inibidores de toxinas em serpentes não peçonhentas permanece desconhecida. Um estudo comparando a presença de PLI em duas espécies do gênero *Elaphe* mostrou uma diferença quantitativa no conteúdo de PLI, em que *E. quadrivirgata*, uma serpente ofiófaga, possui mais PLI em comparação com *E. climacophora*, serpente não ofiófaga (SHIRAI et al., 2009), o que evidenciou que o contato com o veneno pode regular positivamente o conteúdo de PLI. Além disso, a ocorrência de PLI em espécies de movimento lento (THWIN et al., 2000, 2002; DONNINI et al., 2011), em que os juvenis podem ser vulneráveis à predação por serpentes ofiófagas simpátricas, traz uma hipótese sobre a possível seleção positiva de tais inibidores nas serpentes peçonhentas por predação.

Neste sentido, o Capítulo 2 mostrou a purificação e caracterização do BoayPLI, inibidor endógeno de *Boa constrictor*, serpente não peçonhenta, com foco na inibição das ações

farmacológicas relacionadas com danos locais por diferentes PLA<sub>2</sub>s isoladas (RODRIGUES et al., 2020). No entanto, apesar da inibição dos efeitos locais causados pelas PLA<sub>2</sub>s isoladas ter sido elucidada, a inibição do efeito anticoagulante da PLA<sub>2</sub> pelo BoαγPLI ainda não foi explorada. Além disso, a ação inibitória em um veneno de uma serpente ofiófaga, que tem PLA<sub>2</sub>s como principais componentes do veneno, não foi investigada. Os estudos de resistência relacionados a presas / predadores têm, em geral, focado em mamíferos (THWIN; GOPALAKRISHNAKONE, 1998; ROCHA et al., 2002; HOLDING; BIARDI; GIBBS, 2016).

Por outro lado, a composição do veneno também poderia sofrer pressões seletivas da interação presa / predador. O veneno foi selecionado independentemente várias vezes durante a evolução. Os venenos são selecionados principalmente para subjugação da presa e também para defesa da serpente (FRY et al., 2009; CASEWELL et al., 2013). Nesse sentido, os venenos de serpentes ofiófagas teriam adaptações em relação às suas presas. Um estudo analisando o transcriptoma da glândula de veneno de *Micrurus fulvius*, mostrou uma diversificação entre as toxinas aparentemente relacionadas com a especialização da dieta, e as altas taxas de seleção sugeriram coevolução na corrida armamentista (MARGRES et al., 2013). Além disso, a dieta tem sido proposta como um fator importante que afeta a composição do veneno em serpentes do gênero *Micrurus* (SILVA; AIRD, 2001).

Neste contexto, *M. laticollaris* é uma das espécies de *Micrurus* mais importantes em termos de relevância médica no México, estando presente em florestas decíduais tropicais (BOLAÑOS; CERDAS; ABALOS, 1918; JOWERS et al., 2019; BRAGA et al., 2020). Mesmo que as informações sobre os efeitos do veneno de *M. laticollaris* sejam escassas (CARBAJAL-SAUCEDO et al., 2013), seu veneno possui alta neurotoxicidade (CARBAJAL-SAUCEDO et al., 2013, 2014), atividade anticoagulante *in vitro* (DASHEVSKY et al., 2021), e seu veneno é composto principalmente por PLA<sub>2</sub>s (LOMONTE et al., 2016). A maioria das PLA<sub>2</sub>s de serpentes *Micrurus* possuem efeitos citotóxicos, miotóxicos, neurotóxicos e anticoagulantes (AIRD et al., 2017; BRAGA et al., 2020). Como a maioria das serpentes *Micrurus*, a *M. laticollaris* é especializada em predação de outras serpentes.

Neste contexto, este trabalho teve como objetivo contribuir para a elucidação do mecanismo de resistência ao inibidor endógeno de *Boa constrictor* sobre a ação anticoagulante de *Micrurus laticollaris*, uma serpente ofiófaga conspecífica.



## 3.2 OBJETIVOS

### 3.2.1 Objetivos gerais

Caracterização da inibição da ação anticoagulante de *Micrurus laticollaris* pelo Bo $\alpha$ PLI, um inibidor endógeno da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*.

### 3.2.2 Objetivos específicos

- Avaliação do potencial inibitório do Bo $\alpha$ PLI em relação ao veneno total;
- Caracterização da inibição da atividade anticoagulante do veneno de uma serpente ofiófaga pelo Bo $\alpha$ PLI;
- Utilização de duas técnicas distintas para avaliação de mudança em tempo de coagulação e força do coágulo
  - Stago StarMax *analyser* e tromboelastografia

### 3.3 MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.3.1 Veneno e Inibidor – obtenção e preparação

O BoayPLI foi previamente obtido, de acordo com o CAPÍTULO 2 e liofilizado. O veneno de *M. laticollaris* liofilizado foi fornecido por Melissa Bérnard-Valle e Alejandro Alagon, Universidad Nacional Autónoma de México. As amostras foram diluídas com ddH<sub>2</sub>O, vortexadas e a concentração de proteína medida com um espectrofotômetro Thermo Fisher Scientific™ NanoDrop 2000 UV-Vis (Thermofisher). Com base nos valores de Nanodrop (280 nm), foram feitos estoques de 1 mg / mL com 50% de glicerol, para preservar a atividade enzimática, em seguida as amostras foram armazenadas -20°C para posteriores análises.

#### 3.3.2 Preparação do plasma

Foi utilizado plasma humano citratado (3,2%), coletado de doadores saudáveis e obtido da Cruz Vermelha Australiana (Acordo de pesquisa n° 18-03QLD-09; Aprovação do Comitê de Ética Humana da Universidade de Queensland n° 2016000256). O plasma (bolsa de plasma em pool, identificação #A540020103540) foi descongelado a 37°C e, em seguida, aliqotado em tubos de 1 mL, congelado rapidamente em nitrogênio líquido e armazenado a -80°C até ser necessário, momento em que uma alíquota foi descongelada a 37°C por 5 min. O plasma foi substituído a cada 1 hora durante a análise para evitar degradação.

#### 3.3.3 Ensaios de coagulação

Os ensaios de coagulação foram realizados em um analisador de hemostasia Stago STA-R Max (Stago, Asnières Sur Seine, França), que mede os tempos de coagulação com base na viscosidade automatizada (medição mecânica) em no máximo 999 segundos. Diferentes proporções de veneno e inibidor (1:2, 1:5, 1:10), com uma concentração final de 10 µg / mL de veneno: 20 µg / mL de BoayPLI; 4 µg / mL de veneno: 20 µg / mL de BoayPLI; 2 µg / mL de veneno: 20 µg / mL de BoayPLI, respectivamente, foi preparado e incubado a 37 °C por dois minutos (ThermoMixer comfort, Eppendorf) e então aplicado na máquina Stago StarMax. Em seguida, 25 µL da amostra foram adicionados a uma cubeta de 250 µL com 50 µL de fosfolipídio solubilizado em tampão Owren-Koller (OK) (catálogo Stago # 00597), 50 µL de CaCl<sub>2</sub> 25 mM (catálogo Stago # 00367), 25 µL de tampão OK (catálogo Stago # 00360) e 75 µL

de plasma. Após 2 minutos de incubação, 25  $\mu$ L de Fator Xa (usado de acordo com o kit Stago; catálogo # 00311) foram adicionados para induzir a coagulação (ZDENEK et al., 2020). Para a realização do controle negativo, foi utilizado ddH<sub>2</sub>O: glicerol 50% como amostra. Além disso, o BoayPLI sem o veneno foi usado como amostra para investigar se o inibidor altera o tempo normal de coagulação. Como controle positivo, o veneno de *M. laticollaris* sem o inibidor em diferentes concentrações foi utilizado. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

### 3.3.4 Tromboelastografia (TEG)

Para medir se o BoayPLI pode inibir a atividade anticoagulante do veneno de *M. laticollaris*, alterando a velocidade de coagulação e a força do coágulo, foi utilizado o analisador de hemostasia Thrombelastogram® 5000 (Haemonetics®, Haemonetics Australia Pty Ltd., North Ryde, Sydney 2113, Austrália), com copos e alfinetes naturais. Resumidamente, 15  $\mu$ L de BoayPLI (concentração de 1 mg / mL), 2  $\mu$ L de veneno de *M. laticollaris* (concentração de 1 mg / mL) foram adicionados a 3  $\mu$ L de tampão OK (catálogo Stago # 00360) e incubados por 120 segundos a 37°C (confort ThermoMixer, Eppendorf). Em seguida, a mistura foi colocada no copo com 72  $\mu$ L de CaCl<sub>2</sub> 25 mM (catálogo Stago # 00367) e 72  $\mu$ L de fosfolipídios diluídos em tampão OK (catálogo Stago # 00597). Finalmente, foram adicionados 189  $\mu$ L de plasma, a mistura foi homogeneizada com pipeta e 7  $\mu$ L de Fator Xa (kit Stago; catálogo # 00311) foram usadas como ativadoras de coagulação. Todo o procedimento, desde a adição do plasma até o início da leitura, foi realizado em 15 segundos para padronização. Os experimentos foram realizados em triplicata. A medição foi feita por 30 minutos. Como controles negativos, ddH<sub>2</sub>O: glicerol 50% substituiu o veneno incubado com inibidor. Além disso, o BoayPLI sem o veneno foi usado como amostra para investigar se o inibidor altera o tempo normal de coagulação induzido pelo FXa. Como controle positivo, o veneno de *M. laticollaris* sem o inibidor foi usado como amostra.

### 3.3.5 Análises estatísticas

As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad PRISM 8.4.3 (GraphPad Prism Inc., La Jolla, CA, EUA), e  $p < 0,05$  foi considerado estatisticamente significativo. Os valores de tempo de coagulação entre os diferentes tratamentos (veneno isolado, veneno incubado com inibidor) foi comparado usando ANOVA de uma via com Sidak

como teste *a posteriori*. As comparações do teste *a posteriori* para averiguar quais tratamentos possuíam diferenças nos tempos de coagulação foram realizadas entre os tratamentos que possuíam a mesma concentração de veneno.

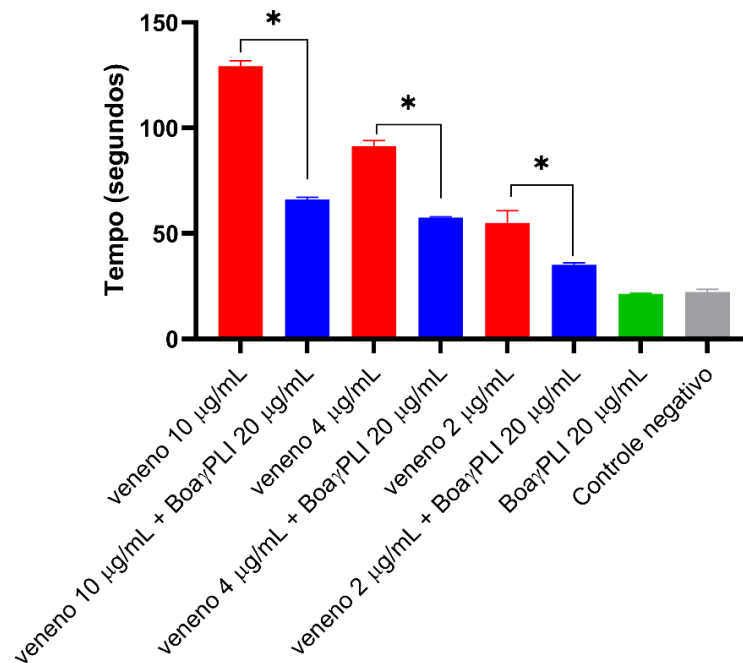
Para os testes tromboelastográficos, ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori* para múltiplas comparações foi usado para comparar os diferentes parâmetros: força do coágulo (amplitude máxima - mm; razão máxima de geração de trombo - dynes / cm<sup>2</sup> / s; geração de trombo total - dynes / cm<sup>2</sup>) e velocidade de coagulação (ponto de divisão - segundos; R - segundos) entre o veneno, o veneno com Boa $\gamma$ PLI, apenas Boa $\gamma$ PLI e o controle negativo. Todos os valores foram apresentados como média  $\pm$  desvio padrão.

### 3.4 RESULTADOS

#### 3.4.1 Ensaio de coagulação (Stago STA-R MAX analyser)

Em um analisador de hemostasia Stago STA-R Max, os tempos de coagulação do veneno de *M. laticollaris* atingiram  $129,3 \pm 2,1$  s na maior concentração testada, que foi cerca de 5 vezes maior do que o controle ( $22,3 \pm 1,1$  s). Observou-se que o Boa $\gamma$ PLI foi eficiente em inibir a ação anticoagulante do veneno de *M. laticollaris* em diferentes proporções, atingindo  $66,2 \pm 0,8$  s na concentração máxima de veneno utilizada. Além disso, o Boa $\gamma$ PLI não interferiu nos tempos de coagulação quando incubado sozinho com o plasma ( $21,5 \pm 0,3$ ) (ANOVA de uma via,  $F(7, 16) = 613,9$ ,  $p < 0,0001$ ; Sidak como teste *a posteriori*;  $p < 0,05$  foi considerado significativo) (Figura 3.1).

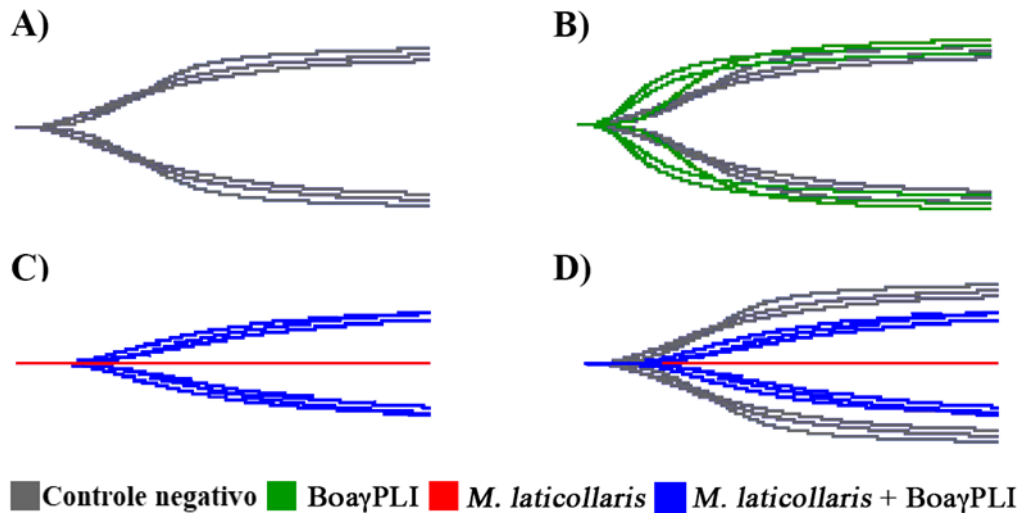
**Figura 3.1** Tempos de coagulação (segundos) do veneno de *M. laticollaris* isolado (vermelho) ou incubado com Bo $\alpha$ PLI (azul) em diferentes proporções (1:2; 1:5; 1:10). O FXa foi usado como um ativador de coagulação (consulte a seção 3.4.1 para obter detalhes). O inibidor reduziu o tempo de coagulação quando incubado com o veneno. \* representa significância estatística (ANOVA de uma via com Sidak como um teste *a posteriori*,  $p < 0,05$  foi considerado significativo. Cada barra é a média de  $n = 3$  com barras de erro representadas pelo desvio padrão.



### 3.4.2 Tromboelastografia (TEG)

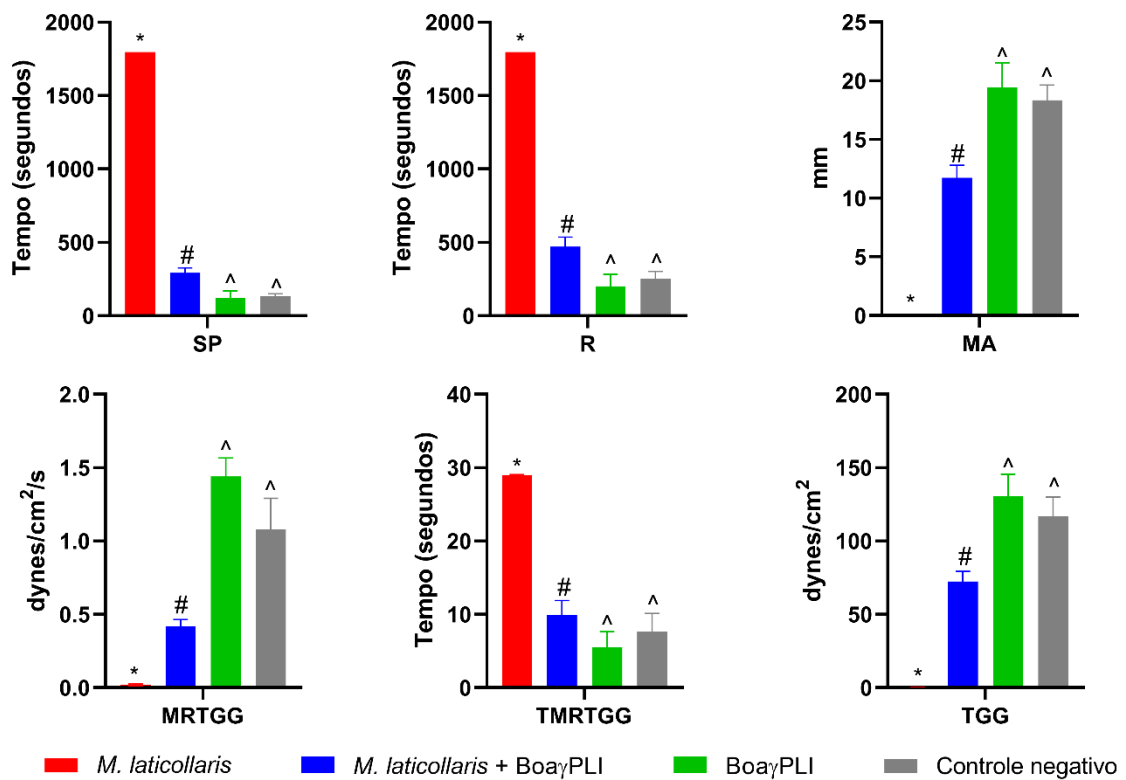
Para corroborar a atividade de inibição, foi realizado o ensaio tromboelastográfico, no qual foi possível analisar as diferenças na velocidade de coagulação e força do coágulo. O veneno de *M. laticollaris*, em razão de sua atividade anticoagulante, não produziu coágulo mesmo com o uso do FXa como ativador. O Bo $\alpha$ PLI isolado não alterou a coagulação normal ativada pelo FXa. Quando incubado com o veneno, o Bo $\alpha$ PLI restaurou a coagulação em condição similar em força do coágulo e velocidade de coagulação ao controle negativo, corroborando com a inibição identificada pelo teste anterior (Figura 3.2).

**Figura 3.2** Traços tromboelastográficos comparando o controle negativo (cinza), Boa $\gamma$ PLI (verde), veneno de *M. laticollaris* (vermelho) e *M. laticollaris* incubado com Boa $\gamma$ PLI (azul). Cada traço representa uma réplica. Três repetições foram executadas por tratamento. É possível observar a ausência de coagulação (linha reta vermelha) com o veneno, e a coagulação restaurada quando o veneno foi pré-incubado com o Boa $\gamma$ PLI (C e D).



Considerando os parâmetros obtidos pela análise tromboelastográfica, é possível perceber que a incubação com o Boa $\gamma$ PLI e o veneno de *M. laticollaris* reduziu significativamente os tempos de coagulação (SP – split point (segundos), R - tempo até o coágulo detectável - 2 mm (segundos), TMTRGG - tempo até a taxa máxima de geração de trombo (minutos)), e aumentou a força do coágulo (MA - amplitude máxima do coágulo (milímetros), MRTGG - taxa máxima de geração de trombo (dynes / cm<sup>2</sup> / s), TGG - trombo total gerado (dynes / cm<sup>2</sup>), sugerindo inibição da atividade anticoagulante do veneno pelo inibidor (Figura 3.3, Tabela 4). O Boa $\gamma$ PLI não alterou a coagulação em comparação com o controle negativo. Além disso, é importante ressaltar que a força do coágulo não atingiu o controle negativo, evidenciando uma inibição parcial já evidenciada pelos demais ensaios.

**Figura 3.3** Parâmetros tromboelastográficos do veneno de *M. laticollaris* (Vermelho), *M. laticollaris* com BoayPLI incubada (azul), BoayPLI (verde) e Controle Negativo (cinza). Os parâmetros avaliam a velocidade de coagulação (SP - ponto de divisão (segundos), R - tempo até o coágulo detectável - 2 mm (segundos), TMTRGG - tempo até a taxa máxima de geração de trombo (minutos)), e a força do coágulo (MA - amplitude máxima do coágulo (milímetros), MRTGG - taxa máxima de geração de trombo (dynes / cm<sup>2</sup> / s), TGG - trombo total gerado (dynes / cm<sup>2</sup>)). Cada experimento foi realizado em triplicata e os valores foram apresentados como média ± desvio padrão. Símbolos diferentes representam significância estatística (ANOVA de uma via com Tukey como teste *a posteriori*). Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.



**Table 3.1** Parâmetros tromboelastográficos do veneno de *M. laticollaris*, *M. laticollaris* incubado com BoayPLI, BoayPLI e controle negativo). Os parâmetros avaliam a velocidade de coagulação (SP – *split point* (segundos), R - tempo até o coágulo detectável - 2 mm (segundos), TMTRGG - tempo até a taxa máxima de geração de trombo (minutos)), e a força do coágulo (MA - amplitude máxima do coágulo (milímetros), MRTGG - taxa máxima de geração de trombo (dynes / cm<sup>2</sup> / s), TGG - trombo total gerado (dynes / cm<sup>2</sup>)).

<b>Parâmetros</b>	<b><i>M. laticollaris</i></b>	<b><i>M. laticollaris</i> + <i>BoayPLI</i></b>	<b>BoayPLI</b>	<b>Controle negativo</b>
<b>SP (segundos)</b>	1795±0	293,333±27,182	121,667±38,586	133,333±12,472
<b>R (segundos)</b>	1795±0	470±54,006	201,667±65,997	251,667±41,700
<b>MA (milímetros)</b>	0±0	11,733±0,865	19,433±1,715	18,333±1,062
<b>MRTGG (dynes/cm<sup>2</sup>/s)</b>	0,167±0,047	0,420±0,062	1,440±0,177	1,080±0,298
<b>TMRTGG (minutos)</b>	0,02±0,008	9,917±1,598	5,500±1,767	7,640±2,018
<b>TGG (dynes/cm<sup>2</sup>)</b>	0,153±0,085	72,483±5,515	130,453±12,164	116,997±10,511



### 3.5 DISCUSSÃO

O estudo mostrou a ação inibitória do BoayPLI, um inibidor endógeno da PLA<sub>2</sub> da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*, contra a atividade anticoagulante do veneno de *M. laticollaris*, uma serpente peçonhenta, simpátrica e com hábitos ofiófagos.

A interação entre presas e predadores promove pressões seletivas relacionadas à coevolução, cujos traços ofensivos e defensivos foram selecionados quanto à eficácia ou resistência à predação, sendo a resistência ao envenenamento um excelente exemplo desse fenômeno (CASEWELL et al., 2013; HOLDING; BIARDI; GIBBS, 2016; ARBUCKLE; RODRÍGUEZ DE LA VEGA; CASEWELL, 2017; GIBBS et al., 2020; HARRIS; FRY, 2021).

A presença de inibidores endógenos de toxinas, como PLIs, promove resistência ao veneno (FORTES-DIAS et al., 2016). Os PLIs foram previamente classificados como inibidores miotóxicos ou neurotóxicos (NEVES-FERREIRA et al., 2009). Em relação ao BoayPLI, o capítulo anterior demonstrou a eficácia na inibição da atividade edematogênica, miotóxica e anticoagulante de diferentes PLA<sub>2</sub>s (RODRIGUES et al., 2020). Porém, o aprofundamento da inibição da atividade anticoagulante, bem como a ação sobre o veneno bruto permaneceram desconhecidos. Em contraste, a inibição dos efeitos anticoagulantes PLA<sub>2</sub>s pelos PLIs como uma forma de auto-resistência ao próprio veneno foi investigada em um pequeno número de estudos (*B. jararacussu* γPLI e αPLI, e *B. alternatus* αPLI, por exemplo) (OLIVEIRA et al., 2008, 2011; SANTOS-FILHO et al., 2011).

Enquanto estudos anteriores foram conduzidos com PLA<sub>2</sub>s isoladas, neste capítulo, utilizamos o veneno bruto de *M. laticollaris*, pois os efeitos do veneno bruto poderiam exercer a pressão de seleção para a evolução de inibidores em espécies que são presas simpátricas de serpentes peçonhentas. *M. laticollaris* foi escolhida para este estudo porque seu veneno possui uma alta porcentagem de PLA<sub>2</sub> em seu veneno (LOMONTE et al., 2016) potente atividade anticoagulante *in vitro* (DASHEVSKY et al., 2021), além de ser ofiófaga. Este delineamento experimental nos permitiu determinar se a inibição foi eficaz, mesmo apesar de possíveis interações entre os componentes do veneno que poderiam interferir no mecanismo de inibição do BoayPLI.

Deste modo, foi evidenciada uma inibição substancial da atividade anticoagulante de *M. laticollaris* pelo BoayPLI de maneira dose-dependente, mostrando que este inibidor pode

fornecer proteção contra componentes anticoagulantes do veneno bruto de uma serpente ofiófaga. Deste modo, Bo $\gamma$ PLI poderia atuar sobre outras ações farmacológicas causadas pelas PLA<sub>2</sub>s. Novos estudos sobre a inibição de PLA<sub>2</sub>s neurotóxicas por Bo $\gamma$ PLI forneceriam informações relevantes sobre seu mecanismo de ação e possível função biológica. Além disso, os resultados também contribuiriam para a evidência de que a atividade anticoagulante no veneno de *M. laticollaris* é impulsionada por PLA<sub>2</sub>s. Mais estudos são necessários para desvendar as relações fisiológicas das serpentes *Micrurus* e a especialização de seu veneno sobre suas presas.

O veneno de *M. laticollaris* possui uma alta concentração de PLA<sub>2</sub>s em sua composição. (LOMONTE et al., 2016), sendo majoritariamente neurotóxica e tendo uma forte atividade anticoagulante *in vitro* (DASHEVSKY et al., 2021). Como dito anteriormente, as PLA<sub>2</sub>s possuem uma ampla gama de efeitos farmacológicos, como: miotoxicidade, neurotoxicidade, anticoagulação, entre outros. Em conjunto, o presente trabalho demonstrou o potencial inibitório das atividades edematogênicas, miotóxicas, anticoagulantes tanto de PLA<sub>2</sub>s isoladas (RODRIGUES et al., 2020), e, em relação à atividade anticoagulante, o presente capítulo também elucidou tal potencial inibitório em relação a um veneno bruto de uma serpente ofiófaga, cuja composição é majoritariamente PLA<sub>2</sub>. Tal achado evidencia que o Bo $\gamma$ PLI poderia atuar sobre outras ações farmacológicas causadas pelas PLA<sub>2</sub>s. Novos estudos sobre a inibição de PLA<sub>2</sub>s neurotóxicas pelo Bo $\gamma$ PLI forneceriam informações relevantes sobre seu mecanismo de ação e possível função biológica.

Estudos sugerem que as PLA<sub>2</sub>s inibem a coagulação sanguínea através de uma miríade de ações, variando da hidrólise de fosfolipídios pró-coagulantes que são necessários para a ativação da cascata de coagulação (KINI, 2003; SAIKIA; MUKHERJEE, 2017), e também através da ligação direta a fatores de coagulação (FAURE; XU; SAUL, 2011; SAIKIA; MUKHERJEE, 2017; BITTENBINDER et al., 2019). Correspondentemente, os inibidores podem atuar sobre nos sítios catalítico ou não catalítico, como o inibidor de  $\alpha$ BaltMIP de *Bothrops alternatus*, que impede as atividades anticoagulante e catalítica do veneno de *B. alternatus* (SANTOS-FILHO et al., 2011). Estudos futuros são necessários para elucidação dos mecanismos de ação do Bo $\gamma$ PLI.

A inibição observada das ações anticoagulantes no presente estudo foi semelhante a achados anteriores (OLIVEIRA et al., 2008, 2011). É importante notar que a maioria dos estudos sobre a inibição da ação anticoagulante pelos PLIs foi realizada com PLA<sub>2</sub>s isoladas

(OLIVEIRA et al., 2008, 2011; SANTOS-FILHO et al., 2011), portanto, os aspectos ecológicos e fisiológicos do veneno bruto não foram considerados.

No entanto, apesar deste capítulo abordar a atividade inibitória contra um veneno total de serpente ofiófaga, é necessário enfatizar que, embora a *Boa constrictor* e *Micrurus laticollaris* sejam simpátricas, e *M. laticollaris* possuir hábito ofiófago, não houve registros de *M. laticollaris* se alimentando de *Boa constrictor*, possivelmente devido às diferenças de tamanho, uma vez que *B. constrictor* é uma serpente grande em comparação com *M. laticollaris*. Portanto, apenas espécimes juvenis poderiam ser predados por *M. laticollaris*.

Mesmo a predação de indivíduos *Boa* pela maioria das espécies de *Micrurus* sendo improvável, a predação por outras serpentes ofiófagas como *Clelia* sp., cujas secreções tóxicas são pouco estudadas, poderia ser uma forte pressão seletiva para *Boa* neonatos e juvenis. Ademais, PLIs foram identificadas em outras espécies de movimento lento que também seriam vulneráveis quando jovens à predação por serpentes ofiófagas, incluindo *Malayopython reticulatus* e *Python sabae* (THWIN et al., 2000, 2002; DONNINI et al., 2011).

Neste contexto, pesquisas adicionais com abordagens evolutivas devem ser feitas para investigar a origem e o papel dos inibidores endógenos que promovem a resistência ao veneno. Futuros estudos de ecologia de campo são necessários para determinar a pressão de seleção imposta por serpentes ofiófagas em espécies de movimento lento, uma vez que em tal área, estudos são escassos. Este estudo, portanto, abre novos caminhos intrigantes de pesquisa de história natural.

Em resumo, Boa $\gamma$ PLI é um inibidor endógeno de PLA<sub>2</sub> isolado da serpente não peçonhenta *Boa constrictor*, que inibe a atividade anticoagulante induzida por PLA<sub>2</sub> da serpente peçonhenta ofiófaga *M. laticollaris*. Esse resultado contribui para o conhecimento desse inibidor e reforça a teoria de que os PLIs são um dos principais responsáveis pela resistência do veneno, mostrando que Boa $\gamma$ PLI tem um importante papel na inibição dos distúrbios da coagulação, importante efeito sistêmico causado pela PLA<sub>2</sub> de veneno de serpentes, além da capacidade de inibir efeitos locais. Deste modo, a evolução desses inibidores parece ter sido selecionada devido às diversas ações tóxicas das PLA<sub>2</sub>s do veneno, incluindo atividades anticoagulantes, miotóxicas e neurotóxicas. Portanto, este estudo abre para discussão o papel dos inibidores na dinâmica ecológica da corrida armamentista química. Ademais, a caracterização de inibidores ofídicos pode auxiliar na mitigação das problemáticas relacionadas aos acidentes ofídicos, uma doença tropical negligenciada.

## CAPÍTULO 4

### 4.1 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS

A resistência ao envenenamento apresentado por serpentes peçonhentas ou não, bem como em animais que interagem com serpentes na forma de presa e/ou predador como alguns mamíferos, vêm despertando interesse sobretudo em razão dos aspectos evolutivos ainda não desvendados, diferentes mecanismos de ação e o caráter biotecnológico que algumas das moléculas relacionadas a tal resistência possuem.

Um dos mecanismos relacionados com a resistência ao envenenamento é a presença de moléculas plasmáticas que possuem capacidade de ligação com toxinas chave que compõem o veneno, como PLA<sub>2</sub>s, que conseqüentemente, inibem seus efeitos farmacológicos, promovendo resistência ao envenenamento.

Algumas hipóteses que suportam evolutivamente a presença de tais inibidores é a proteção contra o auto envenenamento e a coevolução proporcionada pela relação presa/predador, também chamado de corrida armamentista. Porém, a presença de tais inibidores em plasmas de serpentes não peçonhentas, como a *Boa constrictor*, espécie selecionada para o presente trabalho, que possui movimentação lenta e é susceptível à predação, abre um leque para futuras investigações sobre como os PLIs foram selecionados evolutivamente e qual seu mecanismo de ação.

A associação de tais proteínas com outros papéis fisiológicos, auxiliando na regulação de isoformas endógenas e não tóxicas das proteínas alvo (como a PLA<sub>2</sub>), além da relação da presença de tais inibidores com o sistema imune inato, semelhante à defesa de patógenos, sem a necessária pré-interação com o veneno, torna robusta a presença desses inibidores em organismos que não necessariamente possuem contato com o veneno.

Neste contexto, a caracterização de inibidores como PLIs em serpentes não peçonhentas, com movimentação lenta, se torna proeminente para adicionar informações que suportem o surgimento de PLIs e suas diferentes ações, através da comparação estrutural e funcional entre inibidores de serpentes peçonhentas e não peçonhentas.

Portanto, o presente estudo mostrou a purificação e caracterização de um PLI $\gamma$  da serpente não peçonhenta *Boa constrictor* (Boa $\gamma$ PLI). Sua caracterização estrutural demonstrou

que o inibidor possui massa de aproximadamente 22 kDa e capacidade de oligomerização, estrutura primária semelhante ao PLI de *Lachesis muta muta*, interação direta com PLA<sub>2</sub> de *Crotalus durissus terrificus* evidenciada por *western blotting*. A interação não covalente que ocorre através de ligações hidrofóbicas foi evidenciada por dicróismo circular e ensaios de fluorescência.

Sua caracterização funcional demonstrou que o Boa $\gamma$ PLI possui inibição da atividade enzimática da Asp-49 PLA<sub>2</sub>, além de seu potencial inibitório contra edema e miotoxicidade induzidos por duas isoformas de PLA<sub>2</sub> (Asp-49 e Lys-49 PLA<sub>2</sub>). Sua capacidade inibitória possui equivalente eficácia entre as isoformas estudadas. Como as PLA<sub>2</sub>s possuem uma vasta gama de efeitos farmacológicos além dos danos locais, o potencial de inibição da atividade anticoagulante da crotoxina e do veneno de *M. laticollaris* pelo Boa $\gamma$ PLI também foi evidenciado.

É importante ressaltar que *M. laticollaris* se alimenta de serpentes, e a resistência ao envenenamento pode estar relacionada com a coevolução presa / predador. Portanto, pressões seletivas podem estar relacionadas com a especialização do veneno da *M. laticollaris*, por ser uma serpente de dieta especialista (serpentes), bem como mecanismos de resistência ao envenenamento podem ter sido selecionados nas presas, sendo um desses mecanismo, a presença de inibidores endógenos.

Além disso, outras hipóteses de ocorrência de inibidores endógenos têm sido levantadas, considerando que essas moléculas poderiam compor o sistema imune inato, e a neofuncionalização dos inibidores, cujos ancestrais estavam relacionados à inibição de proteínas fisiológicas e atóxicas de serpentes.

Ademais, sua baixa recuperação em comparação à PLIs de serpentes peçonhentas submetidas ao mesmo processo de purificação como o PLI de *B. jararaca* sugere a regulação positiva da expressão do inibidor quando há um contato constante com o veneno, reforçando sua atuação na proteção contra o auto envenenamento. Entretanto, foi evidenciada a semelhança estrutural e funcional do Boa $\gamma$ PLI em relação a inibidores provenientes de serpentes peçonhentas, reforçando a alta conservação entre tais moléculas.

Além disso, é importante pontuar o caráter biotecnológico na caracterização estrutural e funcional dos PLIs. Sendo os PLIs inibidores de PLA<sub>2</sub> do grupo IIA, cujo grupo abrange

PLA<sub>2</sub>s de viperídeos e PLA<sub>2</sub>s pró-inflamatórias de mamíferos, o isolamento e caracterização de PLIys distintos pode auxiliar no enriquecimento de informações para a bioprospecção de moléculas que auxiliem, não apenas na terapia antiveneno, como também em outros processos inflamatórios desencadeados pelas PLA<sub>2</sub>s humanas, uma vez que seu sítio catalítico é bem conservado.

Em síntese, o presente estudo pode contribuir para a elucidação da presença do inibidor de PLA<sub>2</sub> em serpentes não peçonhentas, além de possibilitar novas perspectivas para inibidores de PLA<sub>2</sub> provenientes de plasma de serpentes, através da caracterização e comparação das semelhanças e diferenças entre PLIs de serpentes peçonhentas e não peçonhentas. Ademais, a caracterização de inibidores ofídicos pode auxiliar na mitigação das problemáticas relacionadas aos acidentes ofídicos, uma doença tropical negligenciada.

## REFERÊNCIAS\*

ADUKAUSKIENÉ, D.; VARANAUSKIENÉ, E.; ADUKAUSKAITÉ, A. Venomous Snakebites. **Medicina (Kaunas)**, v. 47, n. 8, p. 461–467, 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/23297851>>.

AIRD, S. D. et al. Coralsnake venomomics: Analyses of venom gland transcriptomes and proteomes of six Brazilian taxa. **Toxins**, v. 9, n. 6, 1 jun. 2017. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC5488037/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/3588037/)>. Acesso em: 16 set. 2020.

ALBINO, A. M.; CARLINI, A. A. First record of *Boa constrictor* (Serpentes, Boidae) in the Quaternary of South America. **Journal of Herpetology**, v. 42, n. 1, p. 82–88, 2008.

ALBULESCU, L.-O. et al. Preclinical validation of a repurposed metal chelator as a community-based therapeutic for hemotoxic snakebite. **Science translational medicine**, v. 12, p. eaay8314, 6 maio 2019. Disponível em: <<https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.aay8314>>. Acesso em: 13 maio. 2020.

ALIROL, E. et al. Antivenoms for Snakebite Envenoming: What Is in the Research Pipeline? **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 10 set. 2015.

AOKI-SHIOI, N.; MODAHL, C. M. Snakebite Therapeutics Based on Endogenous Inhibitors from Vipers. In: **Medical Toxicology**. [s.l.: s.n.]ip. 13.

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, 15 dez. 2017.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. **Phospholipase A2 - A structural review** Toxicon Elsevier Ltd, , 1996. .

BARCHAN, D. et al. How the mongoose can fight the snake: The binding site of the mongoose

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

acetylcholine receptor. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 89, n. 16, p. 7717–7721, 15 ago. 1992. Disponível em: <<https://www.pnas.org/content/89/16/7717>>. Acesso em: 18 dez. 2020.

BARCHAN, D. et al. The Binding Site of the Nicotinic Acetylcholine Receptor in Animal Species Resistant to  $\beta$ -Bungarotoxin. **Biochemistry**, v. 34, n. 28, p. 9172–9176, 1995. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7619817/>>. Acesso em: 18 dez. 2020.

BASTOS, V. A. et al. Natural inhibitors of snake venom metalloendopeptidases: History and current challenges. **Toxins**, v. 8, n. 9, 2016.

BELCHOR, M. N. et al. Evaluation of rhamnetin as an inhibitor of the pharmacological effect of secretory phospholipase A2. **Molecules**, v. 22, n. 9, 2017.

BIARDI, J. E.; COSS, R. G. Rock squirrel (*Spermophilus variegatus*) blood sera affects proteolytic and hemolytic activities of rattlesnake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 2, p. 323–331, 1 fev. 2011.

BITTENBINDER, M. A. et al. Differential destructive (non-clotting) fibrinogenolytic activity in Afro-Asian elapid snake venoms and the links to defensive hooding behavior. **Toxicology in Vitro**, v. 60, p. 330–335, 1 out. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31170449>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

BOLAÑOS, R.; CERDAS, L.; ABALOS, J. W. Venoms of coral snakes (*Micrurus* spp.): report on a multivalent antivenin for the Americas'. **Bull Pan Am Health Organ**, v. 12, n. 1, 1918.

BOURKE, L. A. et al. *Trimeresurus albolabris* snakebite treatment implications arising from ontogenetic venom comparisons of anticoagulant function, and antivenom efficacy. **Toxicology Letters**, v. 327, p. 2–8, 19 mar. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427420300898>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

BRAGA, J. R. M. et al. Renal effects of venoms of Mexican coral snakes *Micrurus browni* and *Micrurus laticollaris*. **Toxicon**, v. 181, p. 45–52, 15 jul. 2020.



BRODIE, E. D. et al. Parallel arms races between garter snakes and newts involving tetrodotoxin as the phenotypic interface of coevolution. **Journal of Chemical Ecology**, v. 31, n. 2, p. 343–356, fev. 2005. Disponível em: <<https://link.springer.com/article/10.1007/s10886-005-1345-x>>. Acesso em: 26 abr. 2021.

BURKE, J. J. E. J.; DENNIS, E. E. a. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of lipid research**, v. 50 Suppl, p. S237-242, maio 2009. Disponível em: <<http://www.jlr.org/content/50/Supplement/S237.short>>. Acesso em: 31 jul. 2014.

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, 1 out. 2019.

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736–1743, 5 jun. 2009.

CALVETE, J. J. Venomics: integrative venom proteomics and beyond. **The Biochemical journal**, v. 474, n. 5, p. 611–634, 20 mar. 2017. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28219972>>. Acesso em: 28 mar. 2018.

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. Disponível em: <<http://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40409-016-0092-5>>.

CARBAJAL-SAUCEDO, A. et al. Isolation, characterization, cloning and expression of an alpha-neurotoxin from the venom of the Mexican coral snake *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae). **Toxicon**, v. 66, p. 64–74, 1 maio 2013.

CARBAJAL-SAUCEDO, A. et al. Neuromuscular activity of *Micrurus laticollaris* (Squamata: Elapidae) venom *in vitro*. **Toxins**, v. 6, n. 1, p. 359–370, 17 jan. 2014. Disponível em: <<http://www.mdpi.com/2072-6651/6/1/359>>. Acesso em: 16 set. 2020.

CASEWELL, N. R. et al. **Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms** *Trends in Ecology and Evolution*, 2013. .

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

CHINNASAMY, S. et al. Combining in silico and in vitro approaches to identification of potent inhibitor against phospholipase A2 (PLA2). **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 144, p. 53–66, 1 fev. 2020.

CHIPPAUX, J.-P. Epidemiology of envenomations by terrestrial venomous animals in Brazil based on case reporting: from obvious facts to contingencies. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 13, 2015. Disponível em: <<http://www.jvat.org/content/21/1/13>>.

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, 8 ago. 2017. Disponível em: <<http://jvat.biomedcentral.com/articles/10.1186/s40409-017-0127-6>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

COTRIM, C. A. et al. Quercetin as an inhibitor of snake venom secretory phospholipase A2. **Chemico-biological interactions**, v. 189, n. 1–2, p. 9–16, 15 jan. 2011. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21056032>>. Acesso em: 19 out. 2014.

DAMERAU, B. et al. Histamine release, formation of prostaglandin-like activity (SRS-C) and mast cell degranulation by the direct lytic factor (DLF) and phospholipase A of cobra venom. **Naunyn-Schmiedeberg's archives of Pharmacology**, v. 156, p. 141–156, 1975. Disponível em: <<http://link.springer.com/article/10.1007/BF00510446>>. Acesso em: 16 out. 2014.

DAN, P.; ROSENBLAT, G.; YEDGAR, S. Phospholipase A2 activities in skin physiology and pathology. **European journal of pharmacology**, v. 691, n. 1–3, p. 1–8, 2012. Disponível em: <<http://ovidsp.ovid.com/ovidweb.cgi?T=JS&PAGE=reference&D=medl&NEWS=N&AN=22819703>>.

DASHEVSKY, D. et al. Anticoagulant *Micrurus* venoms: Targets and neutralization. **Toxicology Letters**, v. 337, p. 91–97, 1 fev. 2021. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427420304677>>. Acesso em: 7 dez. 2020.

DE WIT, C. A.; WESTRÖM, B. R. Venom resistance in the Hedgehog, *Erinaceus europaeus*: Purification and identification of macroglobulin inhibitors as plasma antihemorrhagic factors.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

**Toxicon**, v. 25, n. 3, p. 315–323, 1987.

DEBONO, J. et al. Habu coagulotoxicity: Clinical implications of the functional diversification of *Protobothrops* snake venoms upon blood clotting factors. **Toxicology in Vitro**, v. 55, p. 62–74, 1 mar. 2019.

DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A2 enzymes: Physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical Reviews**, v. 111, n. 10, p. 6130–6185, 12 out. 2011. Disponível em: <<https://pubs.acs.org/sharingguidelines>>. Acesso em: 15 jul. 2020.

DONNINI, S. et al. A novel protein from the serum of *Python sebae*, structurally homologous with type- $\gamma$  phospholipase A2 inhibitor, displays antitumour activity. **Biochemical Journal**, v. 440, n. 2, p. 251–262, 2011. Disponível em: <<http://biochemj.org/lookup/doi/10.1042/BJ20100739>>.

DRABECK, D. H.; DEAN, A. M.; JANSA, S. A. Why the honey badger don't care: Convergent evolution of venom-targeted nicotinic acetylcholine receptors in mammals that survive venomous snake bites. **Toxicon**, v. 99, p. 68–72, 1 jun. 2015.

DUNN, R. D.; BROADY, K. W. Snake inhibitors of phospholipase A2 enzymes. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1533, n. 1, p. 29–37, 2001. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S138819810100138X>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

ESTEVIÃO-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. 122–129, jul. 2008. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0041010108003504>>. Acesso em: 28 nov. 2018.

FALODUN, A.; OWOLABI, O. J.; OSAHON, O. Physicochemical, antimicrobial and anti-inflammatory evaluation of fixed oil from *Boa constrictor*. **Acta Poloniae Pharmaceutica - Drug Research**, v. 65, n. 4, p. 477–480, 2008.

FAN, H. W.; MONTEIRO, W. M. History and perspectives on how to ensure antivenom accessibility in the most remote areas in Brazil. **Toxicon**, v. 151, p. 15–23, 1 set. 2018.

FAURE, G.; XU, H.; SAUL, F. Anticoagulant phospholipases A2 which bind to the specific soluble receptor coagulation factor Xa. In: **Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside**. [s.l.] Springer Netherlands, 2011. p. 201–217.

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

FORTES-DIAS, C. L. et al. Phospholipase A2 Inhibitors from Snake Blood (sbPLIs). In: **Snake Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2016. 54p. 1–18.

FORTES-DIAS, C. L. et al. Identification, description and structural analysis of beta phospholipase A2 inhibitors (sb $\beta$ PLIs) from Latin American pit vipers indicate a binding site region for basic snake venom phospholipases A 2. **Toxicon: X**, v. 2, 1 abr. 2019. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/32550566/>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

FORTES-DIAS, C. L. et al. Identification and characterization of the first endogenous phospholipase A2 inhibitor from a non-venomous tropical snake, *Boa constrictor* (Serpentes: Boidae). **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 26, 2020.

FORTES-DIAS, C. L.; BARCELLOS, C. J.; ESTEVÃO-COSTA, M. I. Molecular cloning of a  $\gamma$ -phospholipase A2 inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). **Toxicon**, v. 41, n. 7, p. 909–917, 2003. Disponível em: <[www.elsevier.com/locate/toxicon](http://www.elsevier.com/locate/toxicon)>. Acesso em: 28 nov. 2018.

FRY, B. G. et al. The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms. **Annual Review of Genomics and Human Genetics**, v. 10, n. 1, p. 483–511, 28 set. 2009. Disponível em: <<http://www.annualreviews.org/doi/10.1146/annurev.genom.9.081307.164356>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

FRY, B. G. Snakebite: When the Human Touch Becomes a Bad Touch. **Toxins**, v. 10, p. 170, 2018. Disponível em: <[www.mdpi.com/journal/toxins](http://www.mdpi.com/journal/toxins)>. Acesso em: 6 maio. 2020.

FRY, B. G. (ed. . **Venomous Reptiles and their Toxins**. [s.l.] Oxford University Press, 2015. v. 53

FUSCO, L. S. et al. New immunization protocol to produce crotalic antivenom combining *Crotalus durissus terrificus* venom and its PLA2. **Biologicals**, v. 43, p. 62–70, 2015.

GHAZARYAN, N. A. et al. Phospholipases A2 from Viperidae snakes: Differences in membranotropic activity between enzymatically active toxin and its inactive isoforms. **Biochimica et Biophysica Acta - Biomembranes**, v. 1848, n. 2, p. 463–468, 1 fev. 2015.

GIBBS, H. L. et al. The molecular basis of venom resistance in a rattlesnake-squirrel predator-prey system. **Molecular Ecology**, p. mec.15529, 27 jun. 2020. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/mec.15529>>. Acesso em: 13 jul. 2020.

GIMENES, S. N. C. et al. Isolation and biochemical characterization of a  $\gamma$ -type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. **Toxicon**, v. 81, p. 58–66, 2014. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010114000257>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

GIMENES, S. N. C. et al. Antitumoral effects of  $\gamma$ dcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, 1 dez. 2017. Disponível em: <[pmc/articles/PMC5539153/?report=abstract](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35539153/)>. Acesso em: 5 ago. 2020.

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**, 28 jul. 2020. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0141813020339829>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

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. 2017, n. 4, 2017.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28462021/>>. Acesso em: 23 jul. 2020.

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

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, n. 7, 2009a.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Stability, distribution and use of antivenoms for snakebite envenomation in Latin America: Report of a workshop. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 625–630, 1 maio 2009b.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, p. 17063, 14 set. 2017. Disponível em: <<http://www.nature.com/articles/nrdp201763>>. Acesso em: 27 set. 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.; THEAKSTON, R. D. 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.

HAINS, P. G.; BROADY, K. W. Purification and inhibitory profile of phospholipase A2 inhibitors from Australian elapid sera. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 1, p. 139–146, 15 fev. 2000. Disponível em: <[/biochemj/article/346/1/139/35364/Purification-and-inhibitory-profile-of](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10811111/)>. Acesso em: 5 ago. 2020.

HARRIS, J. B. et al. The neurotoxicity of the venom phospholipases A2, notexin and taipoxin. **Experimental Neurology**, v. 161, n. 2, p. 517–526, 1 fev. 2000.

HARRIS, R. J.; FRY, B. G. Electrostatic resistance to alpha-neurotoxins conferred by charge reversal mutations in nicotinic acetylcholine receptors. **Proceedings. Biological sciences**, v. 288, n. 1942, p. 20202703, 2021.

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

HIGUCHI, D. A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, n. 3, p. 319–328, 1 mar. 2007. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0300908406002446>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

HOLDING, M. L.; BIARDI, J. E.; GIBBS, H. L. Coevolution of venom function and venom resistance in a rattlesnake predator and its squirrel prey. **Proceedings of the Royal Society B: Biological Sciences**, v. 283, n. 1829, 27 abr. 2016. Disponível em: <[/pmc/articles/PMC4855376/?report=abstract](https://pmc/articles/PMC4855376/?report=abstract)>. Acesso em: 15 jul. 2020.

INOUE, S. et al. Specificity of two types of phospholipase A2 inhibitors from the plasma of venomous snakes. **IUBMB Life**, v. 41, n. 3, p. 529–537, 1 mar. 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216549700201551>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

JONES, L.; HARRIS, R. J.; FRY, B. G. Not Goanna Get Me: Mutations in the Savannah Monitor Lizard (*Varanus exanthematicus*) Nicotinic Acetylcholine Receptor Confer Reduced Susceptibility to Sympatric Cobra Venoms. **Neurotoxicity Research**, n. 0123456789, 2021. Disponível em: <<https://doi.org/10.1007/s12640-021-00351-z>>.

JOWERS, M. J. et al. Phylogeography of West Indies Coral snakes (*Micrurus*): Island colonisation and banding patterns. **Zoologica Scripta**, v. 48, n. 3, p. 263–276, 21 maio 2019. Disponível em: <<https://onlinelibrary.wiley.com/doi/abs/10.1111/zsc.12346>>. Acesso em: 16 set. 2020.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

KAKARLA, S.; GOTTSCHALK, S. CAR T Cells for Solid Tumors: Armed and Ready to Go? **The Cancer Journal**, v. 20, n. 2, p. 151–155, 2014.

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: Structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4544–4576, dez. 2011. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21470368/>>. Acesso em: 20 jul. 2020.

KASTURIRATNE, A. et al. The global burden of snakebite: A literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. **PLoS Medicine**, v. 5, n. 11, p. 1591–1604, 4 nov. 2008. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pmed.0050218>>. Acesso em: 27 set. 2018.

KHAN, M. A. et al. Widespread Evolution of Molecular Resistance to Snake Venom  $\alpha$ -Neurotoxins in Vertebrates. **Toxins**, v. 12, n. 10, p. 638, 2 out. 2020. Disponível em: <<https://www.mdpi.com/2072-6651/12/10/638>>. Acesso em: 18 dez. 2020.

KINI, R. M. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827–840, 1 dez. 2003. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010103003246>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

KINI, R. M. The intriguing world of prothrombin activators from snake venom. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1133–1145, 2005a.

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1147–1161, 2005b. Disponível em: <<http://sdmc.>>. Acesso em: 25 fev. 2019.

KINI, R. M. Anticoagulant proteins from snake venoms: Structure, function and mechanism. **Biochemical Journal**, v. 397, n. 3, p. 377–387, 2006.

KINI, R. M. et al. **Toxins and hemostasis: From bench to bedside**. [s.l.] Springer, 2011.

KINI, R. M.; RAO, V. S.; JOSEPH, J. S. Procoagulant proteins from snake venoms.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.



**Haemostasis**, v. 31, n. 3–6, p. 218–224, 2001.

KINKAWA, K. et al. Up-regulation of the expressions of phospholipase A2 inhibitors in the liver of a venomous snake by its own venom phospholipase A2. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 395, n. 3, p. 377–381, 2010. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.bbrc.2010.04.024>>.

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65–106, 1987.

KOH, C. Y.; BENDRE, R.; KINI, R. M. **Repurposed drug to the rescue of snakebite victims** *Science translational medicine* American Association for the Advancement of Science, , 6 maio 2020. Disponível em: <<https://stm.sciencemag.org/lookup/doi/10.1126/scitranslmed.abb6700>>. Acesso em: 13 maio. 2020.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–5, 1970. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/5432063>>.

LAMBEAU, G. et al. Identification and Purification of a Very High Affinity Binding Protein for Toxic Phospholipases A2 in Skeletal Muscle. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 265, n. 16, p. 9526–9532, 1990. Disponível em: <<http://www.jbc.org/content/265/16/9526.full.pdf>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010115301215>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

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.

LIMA, R. M. et al. Phospholipase A2 inhibitors ( $\beta$ PLIs) are encoded in the venom glands of *Lachesis muta* (Crotalinae, Viperidae) snakes. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 172–175, 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.005>>.

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

LIZANO, S. et al. Two phospholipase 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. **Biochemical Journal**, v. 346, n. 3, 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. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010103003337>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

LOMONTE, B. et al. Venoms of *Micrurus* coral snakes: Evolutionary trends in compositional patterns emerging from proteomic analyses. **Toxicon**, v. 122, p. 7–25, 1 nov. 2016.

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

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.

MALIQUE, C. M. S.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebite Envenomation in Central and South America. In: **Critical Care Toxicology**. [s.l: s.n.]p. 1–22.

MARCUSSI, S. et al. Snake Venom Phospholipase A2 Inhibitors: Medicinal Chemistry and

Therapeutic Potential. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 7, n. 8, p. 743–756, 1 abr. 2007. Disponível em:

<<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=7&issue=8&spage=743>>.

MARGRES, M. J. et al. The venom-gland transcriptome of the eastern coral snake (*Micrurus fulvius*) reveals high venom complexity in the intragenomic evolution of venoms. **BMC Genomics**, v. 14, n. 1, p. 531, 2 ago. 2013. Disponível em: <<http://bmcgenomics.biomedcentral.com/articles/10.1186/1471-2164-14-531>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

MCGLOTHLIN, J. W. et al. Parallel Evolution of Tetrodotoxin Resistance in Three Voltage-Gated Sodium Channel Genes in the Garter Snake *Thamnophis sirtalis*. **Molecular Biology and Evolution**, v. 31, n. 11, p. 2836–2846, 1 nov. 2014. Disponível em: <<https://academic.oup.com/mbe/article-lookup/doi/10.1093/molbev/msu237>>. Acesso em: 27 abr. 2021.

MINISTÉRIO DA SAÚDE, M. da. **Acidente por animais pelonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Sinan.**

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. Disponível em: <[www.plosone.org](http://www.plosone.org)>. Acesso em: 9 jul. 2020.

MURAKAMI, M. et al. Emerging roles of secreted phospholipase A2 enzymes: The 3rd edition. **Biochimie**, v. 107, n. Part A, p. 105–113, dez. 2014. Disponível em: <<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0300908414002521>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

MURAKAMI, M. Novel functions of phospholipase A2s: Overview. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1864, n. 6, p. 763–765, 1 jun. 2019.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y. Secreted phospholipase A2 and mast cells. **Allergology International**, v. 64, n. 1, p. 4–10, jan. 2015. Disponível em:

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

<<http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1323893014000112>>. Acesso em: 14 nov. 2016.

NEVES-FERREIRA, A. G. da C. et al. Enzyme inhibitors in reptile venoms and innate immunity to snake venoms. In: **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. [s.l.] CRC Press, 2009. 1p. 257–276.

NOBUHISA, I. et al. Characterization and Evolution of a Gene Encoding a *Trimeresurus flavoviridis* Serum Protein that Inhibits Basic Phospholipase A2 Isozymes in the Snake's Venom. **European Journal of Biochemistry**, v. 249, n. 3, p. 838–845, 1 nov. 1997. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1111/j.1432-1033.1997.00838.x>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

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, 16 jun. 1998.

OHKURA, N. et al. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Journal of Biochemistry**, v. 113, n. 4, p. 413–419, 1993. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/8514730/>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

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, 15 nov. 1994. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/7980598/>>. Acesso em: 30 jul. 2020.

OKUMURA, K. et al. cDNA cloning and bacterial expression of phospholipase A2 inhibitor PLI $\alpha$  from the serum of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1441, n. 1, p. 51–60, 18 out. 1999. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10526227>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

OKUMURA, K. et al. Identification and Characterization of a Serum Protein Homologous to  $\alpha$ -type Phospholipase A 2 Inhibitor (PLI $\alpha$ ) from a Nonvenomous Snake, *Elaphe quadrivirgata*.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

**IUBMB Life (International Union of Biochemistry and Molecular Biology: Life)**, v. 55, n. 9, p. 539–545, 1 set. 2003. Disponível em: <<http://doi.wiley.com/10.1080/15216540310001620995>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

OLIVEIRA, C. Z. et al. An  $\alpha$ -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 a  $\gamma$ -Type Phospholipase A2 Inhibitor from *Bothrops jararacussu* Snake Plasma. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 11, n. 20, p. 2509–2519, 1 out. 2011. Disponível em: <<http://www.eurekaselect.com/openurl/content.php?genre=article&issn=1568-0266&volume=11&issue=20&page=2509>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

OLIVEIRA, D. G. et al. Structural and functional characterization of basic PLA2 isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, n. 3, p. 161–168, 2002.

OULION, B. et al. Factor X activating *Atractaspis* snake venoms and the relative coagulotoxicity neutralising efficacy of African antivenoms. **Toxicology Letters**, v. 288, p. 119–128, maio 2018. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427418300675>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

OUYANG, C.; TETVG, C.-M.; HUANG, T.-F. Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. **Toxicon**, v. 30, n. 9, p. 945–966, 1992. Disponível em: <[https://ac.els-cdn.com/004101019290040C/1-s2.0-004101019290040C-main.pdf?\\_tid=4e5d26c7-819e-429d-ac06-2a70f4ba2464&acdnat=1547742541\\_ofc2845b905a24faecd7661d97e44d59](https://ac.els-cdn.com/004101019290040C/1-s2.0-004101019290040C-main.pdf?_tid=4e5d26c7-819e-429d-ac06-2a70f4ba2464&acdnat=1547742541_ofc2845b905a24faecd7661d97e44d59)>. Acesso em: 17 jan. 2019.

PETROZZI, L. et al. Mitochondria and neurodegeneration. **Bioscience reports**, v. 27, n. 1–3, p. 87–104, jun. 2007. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/17486441>>. Acesso em: 17 nov. 2014.

PICELLI, C. G. et al. Molecular cloning and structural modelling of gamma-phospholipase A

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

2 inhibitors from *Bothrops atrox* and *Micrurus lemniscatus* snakes. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 525–532, 2017. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0141813017303987>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

PICOLO, G. et al. Evaluation of antivenoms in the neutralization of hyperalgesia and edema induced by *Bothrops jararaca* and *Bothrops asper* snake venoms. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 35, n. 10, p. 1221–1228, 2002.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. a. V. Reproductive Ecology of Boine Snakes With Emphasis on Brazilian Species and a Comparison To Pythons. **South American Journal of Herpetology**, v. 2, n. 2, p. 107–122, 2007.

PIZZATTO, L.; MARQUES, O. A. V; FACURE, K. Food habits of Brazilian boid snakes: overview and new data, with special reference to *Corallus hortulanus*. **Amphibia-Reptilia**, v. 30, p. 533–544, 2009. Disponível em: <[www.brill.nl/amre](http://www.brill.nl/amre)>. Acesso em: 5 ago. 2020.

PRABHAKAR, D. R.; MOTIRAM, M. V.; GHANSHYAM, C. B. Antivenoms in Snake Envenoming: Are they Safe? **Journal of Clinical Toxicology**, v. 04, n. 02, 2014.

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, 15 jun. 2018. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29654870>>. Acesso em: 1 out. 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.

QUICK, J. S. et al. Recent Occurrence and Dietary Habits of *Boa constrictor* on Aruba, Dutch West Indies. **Journal of Herpetology**, v. 39, n. 2, p. 304–307, 1 jun. 2005. Disponível em: <<http://www.bioone.org/doi/abs/10.1670/45-04N>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

QUIRÓS, S. et al. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new  $\alpha$ -type phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer*

(Viperidae: Crotalinae). **Comparative Biochemistry and Physiology - B Biochemistry and Molecular Biology**, v. 146, n. 1, p. 60–68, 2007.

REED, R. N.; RODDA, G. H. Giant Constrictors: Biological and Management Profiles and an Establishment Risk Assessment for Nine Large Species of *Pythons*, *Anacondas*, and the *Boa constrictor*. **Journal of Chemical Information and Modeling**, v. 53, n. 9, p. 1689–1699, 2013.

RIGDEN, D. J. et al. The structure of the D49 phospholipase A2 piratoxin III from *Bothrops pirajai* reveals unprecedented structural displacement of the calcium-binding loop: Possible relationship to cooperative substrate binding. **Acta Crystallographica - Section D Biological Crystallography**, v. 59, n. 2, p. 255–262, 2003.

ROCHA-SANTOS, G. da; BARBIER, E.; BORDIGNON, M. O. Sweet trap: *Boa constrictor* (Serpentes: Boidae) preying on passerines on *Cecropia pachystachya* (Urticales: Cecropiaceae) in fruiting period. **Biota Neotropica**, v. 14, n. 2, jun. 2014. Disponível em: <<http://www.bioanimal.ufms.br>>. Acesso em: 5 ago. 2020.

ROCHA, S. L. G. et al. Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 24, p. 6052–6062, dez. 2002. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12473101>>. Acesso em: 13 nov. 2018.

RODRIGUES, C. F. B. 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, p. e0229657, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229657>>. Acesso em: 19 mar. 2020.

RODRÍGUEZ, J. P. et al. A lipidomic perspective of the action of group iia secreted phospholipase a2 on human monocytes: Lipid droplet biogenesis and activation of cytosolic phospholipase a2 $\alpha$ . **Biomolecules**, v. 10, n. 6, p. 1–20, 2020.

SAIKIA, D.; MUKHERJEE, A. K. Anticoagulant and Membrane Damaging Properties of Snake Venom Phospholipase A2 Enzymes. In: **Snake Venoms**. Dordrecht: Springer Netherlands, 2017. p. 87–104.

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

SALVADOR, G. H. M. et al. Structural basis for phospholipase A2-like toxin inhibition by the synthetic compound Varespladib (LY315920). **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, 2019. Disponível em: <[www.nature.com/scientificreports](http://www.nature.com/scientificreports)>. Acesso em: 28 jan. 2020.

SALZANO, S. et al. Linkage of inflammation and oxidative stress via release of glutathionylated peroxiredoxin-2, which acts as a danger signal. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 111, n. 33, p. 12157–62, 19 ago. 2014. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25097261>>. Acesso em: 22 nov. 2014.

SAMY, R. P. et al. Therapeutic application of natural inhibitors against snake venom phospholipase A2. **Bioinformation**, v. 8, n. 1, p. 48–57, 2012.

SANCHES, P. R. et al. Predation on *Iguana iguana* (Squamata: Iguanidae) by *Boa constrictor* (Squamata: Boidae) in a fluvial island in the Amazonas river, Brazil, including a list of saurophagy events with *Boa constrictor* as predator. **Cuad. herpetol.**, v. 32, n. 2, p. 129–132, 2018.

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, 1 mar. 2011. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.biochi.2010.11.016>>. Acesso em: 17 jan. 2019.

SANTOS-FILHO, N. A.; SANTOS, C. T. Alpha-type phospholipase A2 inhibitors from snake blood. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 19, 2017. Disponível em: <<http://download.springer.com/static/pdf/343/art:10.1186/s40409-017-0110-2.pdf?originUrl=http://jvat.biomedcentral.com/article/10.1186/s40409-017-0110-2&token2=exp=1496349458~acl=/static/pdf/343/art%3A10.1186%2Fs40409-01>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; BOLDRINI-FRANÇA, J. Myotoxin Inhibitors. **Toxins and Drug Discovery**, p. 1–22, 2015. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/978-94-007-6726-3>>.



SANTOS BARRETO, G. N. L. et al. Experimental *Bothrops atrox* envenomation: Efficacy of antivenom therapy and the combination of *Bothrops* antivenom with dexamethasone. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 11, n. 3, p. e0005458, 17 mar. 2017. Disponível em: <<http://dx.plos.org/10.1371/journal.pntd.0005458>>. Acesso em: 27 set. 2018.

SAVAGE, J. M.; BOLAÑOS, F. A checklist of the amphibians and reptiles of Costa Rica: Additions and nomenclatural revisions. **Zootaxa**, 2009.

SCHMEDA-HIRSCHMANN, G. et al. Anti-inflammatory activity of animal oils from the Peruvian Amazon. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 156, p. 9–15, 2014. Disponível em: <<http://dx.doi.org/10.1016/j.jep.2014.08.010>>.

SERINO-SILVA, C. et al. Purification and characterization of the first  $\gamma$ -phospholipase inhibitor ( $\gamma$ PLI) from *Bothrops jararaca* snake serum. **PLoS ONE**, v. 13, n. 3, p. e0193105, 2018.

SHIRAI, R. et al. Identification and characterization of phospholipase A2 inhibitors from the serum of the Japanese rat snake, *Elaphe climacophora*. **Toxicon**, v. 53, n. 6, p. 685–692, 2009. Disponível em: <<http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010109000877>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

SHIRAI, R. et al. Autologous extracellular cytochrome c is an endogenous ligand for leucine-rich  $\alpha$ 2-glycoprotein and  $\beta$ -type phospholipase A2 inhibitor. **Journal of Biological Chemistry**, v. 285, n. 28, p. 21607–21614, 9 jul. 2010. Disponível em: <<http://www.jbc.org/>>. Acesso em: 6 ago. 2020.

SILVA, N. J.; AIRD, S. D. Prey specificity, comparative lethality and compositional differences of coral snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 128, n. 3, p. 425–456, 2001. Disponível em: <<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/11255115/>>. Acesso em: 28 abr. 2021.

SINGH, S. B. et al. Phospholipase A2 with platelet aggregation inhibitor activity from *Austrelaps superbus* venom: Protein purification and cDNA cloning. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 375, n. 2, p. 289–303, 15 mar. 2000. Disponível em:

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

<<https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/10700385/>>. Acesso em: 9 jul. 2020.

SO, S. et al. Identification of the B subtype of  $\gamma$ -phospholipase A2 inhibitor from *Protobothrops flavoviridis* serum and molecular evolution of snake serum phospholipase A2 inhibitors. **Journal of Molecular Evolution**, v. 66, n. 3, p. 298–307, 4 mar. 2008. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/s00239-008-9089-1>>. Acesso em: 1 jun. 2017.

SO, S. et al. Identification and evolution of venom phospholipase A2 inhibitors from *Protobothrops elegans* serum. **Bioscience, biotechnology, and biochemistry**, v. 75, n. 3, p. 480–488, 2011.

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 characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 378, n. 2, p. 201–9, 2000.

SOARES, A. M. et al. Medicinal Plants with Inhibitory Properties Against Snake Venoms. **Current Medicinal Chemistry**, v. 12, p. 2625–2641, 2005. Disponível em: <<http://www.ingentaconnect.com/content/ben/cmc/2005/00000012/00000022/art00004>>. Acesso em: 12 nov. 2014.

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, 24 out. 2019.

TAKACS, Z.; WILHELMSSEN, K. C.; SOROTA, S. Snake  $\alpha$ -Neurotoxin Binding Site on the Egyptian Cobra (*Naja haje*) Nicotinic Acetylcholine Receptor Is Conserved. **Molecular Biology and Evolution**, v. 18, n. 9, p. 1800–1809, 1 set. 2001. Disponível em: <<http://academic.oup.com/mbe/article/18/9/1800/1000788>>. Acesso em: 18 dez. 2020.

TAKACS, Z.; WILHELMSSEN, K. C.; SOROTA, S. Cobra (*Naja spp.*) nicotinic acetylcholine

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

receptor exhibits resistance to Erabu sea snake (*Laticauda semifasciata*) short-chain  $\alpha$ -neurotoxin. **Journal of Molecular Evolution**, v. 58, n. 5, p. 516–526, 2004.

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.

TEIXEIRA, C. et al. Inflammation Induced by Platelet-Activating Viperid Snake Venoms: Perspectives on Thromboinflammation. **Frontiers in Immunology**, v. 10, 4 set. 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6737392/?report=abstract>. Acesso em: 22 jul. 2020.

TEIXEIRA, C. F. P. et al. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 947–962, 1 dez. 2003.

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. Disponível em: <https://pubs.acs.org/doi/abs/10.1021/bi000395z>. Acesso em: 16 ago. 2018.

THWIN, M. M. et al. Functional site of endogenous phospholipase A2 inhibitor from python serum: Phospholipase A2 binding and anti-inflammatory activity. **European Journal of Biochemistry**, v. 269, n. 2, p. 719–727, 2002.

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. 1471–1482, 1998.

TOYAMA, M. H. et al. Effects of low molecular weight sulfated galactan fragments from *Botryocladia occidentalis* on the pharmacological and enzymatic activity of sPLA2 from *Crotalus durissus cascavella*. **Protein Journal**, v. 29, n. 8, p. 567–571, 2010.

UJVARI, B. et al. Widespread convergence in toxin resistance by predictable molecular evolution. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 112, n. 38, p. 11911–11916, 22 set. 2015. Disponível em:

De acordo com: ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS NB6823: informação e documentação: referências: elaboração. Rio de Janeiro, 2002, 24p.

<[www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1511706112](http://www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1511706112)>. Acesso em: 28 abr. 2021.

VAN VALEN, L. A new evolutionary theory. **Evolutionary Theory**, v. 1, n. 1, p. 1–30, 1973.

WARRELL, D. A. D. A. Snake bite. **Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 77–88, 2 jan. 2010. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0140673609617542>>. Acesso em: 27 set. 2018.

WHITING, D.; DINARDO, J. A. **TEG and ROTEM: Technology and clinical applications** **American Journal of Hematology**, 2014. .

WILLIAMS, D. et al. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite. **The Lancet**, v. 375, n. 9708, p. 89–91, 2010.

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. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/29318152>>. Acesso em: 27 mar. 2018.

XIONG, S. et al. Investigation of the inhibitory potential of phospholipase A2 inhibitor gamma from *Sinonatrix annularis* to snake envenomation. **Toxicon**, v. 137, p. 83–91, 1 out. 2017. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010117302301?via%3Dihub>>. Acesso em: 4 abr. 2018.

YOUNGMAN, N. J. et al. Mud in the blood: Novel potent anticoagulant coagulotoxicity in the venoms of the Australian elapid snake genus *Denisonia* (mud adders) and relative antivenom efficacy. **Toxicology Letters**, v. 302, p. 1–6, 1 mar. 2019. Disponível em: <<https://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0378427418318290>>. Acesso em: 18 fev. 2019.

YOUNGMAN, N. J. et al. Varespladib (LY315920) neutralises phospholipase A2 mediated prothrombinase-inhibition induced by Bitis snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology Part - C: Toxicology and Pharmacology**, v. 236, n. June, p. 108818, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2020.108818>>.

ZDENEK, C. N. et al. Coagulotoxic effects by brown snake (*Pseudonaja*) and taipan (*Oxyuranus*) venoms, and the efficacy of a new antivenom. **Toxicology in Vitro**, v. 58, p. 97–109, 1 ago. 2019. Disponível em: <<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30910521>>. Acesso em: 26 mar. 2020.

ZDENEK, C. N. et al. Anticoagulant activity of black snake (Elapidae: Pseudechis) venoms: Mechanisms, potency, and antivenom efficacy. **Toxicology Letters**, v. 330, n. December 2019, p. 176–184, 2020.

ZHANG, D. et al. The inhibitory effect of saPLIγ a snake sourced PLA2 inhibitor on carrageenan-induced inflammation in mice. **Toxicon**, v. 151, p. 89–95, 1 set. 2018. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S004101011830299X>>. Acesso em: 16 ago. 2018.

ZHONG, L.; HUANG, C. Isolation and biochemical characterization of a gamma-type phospholipase A2 inhibitor from *Macropisthodon rudis* snake serum. **Toxicon**, v. 122, n. 2016, p. 1–6, 1 nov. 2016. Disponível em: <<https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0041010116302744>>. Acesso em: 16 out. 2018.

## ANEXO 1

Artigo publicado na revista PLOS ONE (fator de impacto - 2.740), sobre a purificação e caracterização estrutural e funcional do inibidor Boa $\gamma$ PLI.

RODRIGUES, C. F. B.; SERINO-SILVA, C.; DE MORAIS-ZANI, K.; KAVAZOI, V. K.; CARVALHO, M. P. N.; GREGO, K. F.; CHIARELLI, T.; TASHIMA, A. K.; TOYAMA, M. H.; TANAKA-AZEVEDO, A. M. Boa $\gamma$ PLI: 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, p. e0229657, 2020. Disponível em: <<https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229657>>.

## RESEARCH ARTICLE

# BoayPLI: Structural and functional characterization of the gamma phospholipase A2 plasma inhibitor from the non-venomous Brazilian snake *Boa constrictor*

Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues<sup>1,2</sup>, Caroline Serino-Silva<sup>1,2</sup>, Karen de Moraes-Zani<sup>1,2</sup>, Victor Koiti Kavazoi<sup>2</sup>, Marcelo Pires Nogueira Carvalho<sup>3</sup>, Kathleen Fernandes Grego<sup>2</sup>, Tassia Chiarelli<sup>4</sup>, Alexandre Keiji Tashima<sup>4</sup>, Marcos Hikari Toyama<sup>5</sup>, Anita Mitico Tanaka-Azevedo<sup>1,2\*</sup>



**1** Interunidades em Biotecnologia, Universidade de São Paulo—Instituto de Pesquisas Tecnológicas—Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil, **2** Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, São Paulo, Brazil, **3** Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brazil, **4** Departamento de Bioquímica, Universidade Federal de São Paulo, São Paulo, São Paulo, Brazil, **5** Instituto de Biociências do Litoral Paulista, Universidade Estadual Paulista, São Vicente, São Paulo, Brazil

\* [anita.azevedo@butantan.gov.br](mailto:anita.azevedo@butantan.gov.br)

## OPEN ACCESS

**Citation:** Rodrigues CFB, Serino-Silva C, Moraes-Zani Kd, Kavazoi VK, Carvalho MPN, Grego KF, et al. (2020) BoayPLI: Structural and functional characterization of the gamma phospholipase A2 plasma inhibitor from the non-venomous Brazilian snake *Boa constrictor*. PLoS ONE 15(2): e0229657. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0229657>

**Editor:** Israel Silman, Weizmann Institute of Science, ISRAEL

**Received:** December 26, 2019

**Accepted:** February 11, 2020

**Published:** February 27, 2020

**Copyright:** © 2020 Rodrigues et al. This is an open access article distributed under the terms of the [Creative Commons Attribution License](https://creativecommons.org/licenses/by/4.0/), which permits unrestricted use, distribution, and reproduction in any medium, provided the original author and source are credited.

**Data Availability Statement:** All relevant data are within the manuscript and its Supporting Information files.

**Funding:** Funded studies: C.F.B.R. - Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Finance Code 001 K.M.Z. - Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP): 2017/16908-2 A.K.T. - Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP): 2017/

## Abstract

Plasma in several organisms has components that promote resistance to envenomation by inhibiting specific proteins from snake venoms, such as phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s). The major hypothesis for inhibitor's presence would be the protection against self-envenomation in venomous snakes, but the occurrence of inhibitors in non-venomous snakes and other animals has opened new perspectives for this molecule. Thus, this study showed for the first time the structural and functional characterization of the PLA<sub>2</sub> inhibitor from the *Boa constrictor* serum (BoayPLI), a non-venomous snake that dwells extensively the Brazilian territory. Therefore, the inhibitor was isolated from *B. constrictor* serum, with 0.63% of recovery. SDS-PAGE showed a band at ~25 kDa under reducing conditions and ~20 kDa under non-reducing conditions. Chromatographic analyses showed the presence of oligomers formed by BoayPLI. Primary structure of BoayPLI suggested an estimated molecular mass of 22 kDa. When BoayPLI was incubated with Asp-49 and Lys-49 PLA<sub>2</sub> there was no severe change in its dichroism spectrum, suggesting a non-covalent interaction. The enzymatic assay showed a dose-dependent inhibition, up to 48.2%, when BoayPLI was incubated with Asp-49 PLA<sub>2</sub>, since Lys-49 PLA<sub>2</sub> has a lack of enzymatic activity. The edematogenic and myotoxic effects of PLA<sub>2</sub>s were also inhibited by BoayPLI. In summary, the present work provides new insights into inhibitors from non-venomous snakes, which possess PLIs in their plasma, although the contact with venom is unlikely.

## 1. Introduction

Snake envenomation, reclassified as a neglected tropical disease by the World Health Organization (WHO), can have serious pathophysiological consequences [1–3]. The pharmacological

## **ANEXO 2**

Artigo publicado na revista *The Journal of Chemical Ecology* (fator de impacto - 2.117), sobre a inibição da atividade anticoagulante do veneno de *M. laticollaris*, serpente ofiófaga, simpátrica e com PLA<sub>2</sub> como componente majoritário do veneno pelo inibidor BoayPLI.





## BoaPLI from *Boa constrictor* Blood is a Broad-Spectrum Inhibitor of Venom PLA<sub>2</sub> Pathophysiological Actions

Caroline Fabri Bittencourt Rodrigues<sup>1,2,3</sup> · Christina N. Zdenek<sup>1</sup> · Caroline Serino-Silva<sup>2,3</sup> · Karen de Moraes-Zani<sup>2,3</sup> · Kathleen Fernandes Grego<sup>2</sup> · Melisa Bénard-Valle<sup>4</sup> · Edgar Neri-Castro<sup>4</sup> · Alejandro Alagón<sup>4</sup> · Anita Mitico Tanaka-Azevedo<sup>2,3</sup> · Bryan Grieg Fry<sup>1</sup>

Received: 24 May 2021 / Revised: 24 May 2021 / Accepted: 9 June 2021 / Published online: 24 June 2021  
 © The Author(s), under exclusive licence to Springer Science+Business Media, LLC, part of Springer Nature 2021

### Abstract

The use of venom in predation exerts a corresponding selection pressure for the evolution of venom resistance. One of the mechanisms related to venom resistance in animals (predators or prey of snakes) is the presence of molecules in the blood that can bind venom toxins, and inhibit their pharmacological effects. One such toxin type are venom phospholipase A<sub>2</sub>s (PLA<sub>2</sub>s), which have diverse effects including anticoagulant, myotoxic, and neurotoxic activities. BoaPLI isolated from the blood of *Boa constrictor* has been previously shown to inhibit venom PLA<sub>2</sub>s that induced myotoxic and edematogenic activities. Recently, in addition to its previously described and very potent neurotoxic effect, the venoms of American coral snakes (*Micrurus* species) have been shown to have anticoagulant activity via PLA<sub>2</sub> toxins. As coral snakes eat other snakes as a major part of their diet, neonate *Boas* could be susceptible to predation by this sympatric species. Thus, this work aimed to ascertain if BoaPLI provided a protective effect against the anticoagulant toxicity of venom from the model species *Micrurus laticollaris* in addition to its ability shown previously against other toxin types. Using a STA R Max coagulation analyser robot to measure the effect upon clotting time, and TEG5000 thromboelastographs to measure the effect upon clot strength, we evaluated the ability of BoaPLI to inhibit *M. laticollaris* venom. Our results indicate that BoaPLI is efficient at inhibiting the *M. laticollaris* anticoagulant effect, reducing the time of coagulation (restoring them closer to non-venom control values) and increasing the clot strength (restoring them closer to non-venom control values). These findings demonstrate that endogenous PLA<sub>2</sub> inhibitors in the blood of non-venomous snakes are multi-functional and provide broad resistance against a myriad of venom PLA<sub>2</sub>-driven toxic effects including coagulotoxicity, myotoxicity, and neurotoxicity. This novel form of resistance could be evidence of selective pressures caused by predation from venomous snakes and stresses the need for field-based research aimed to expand our understanding of the evolutionary dynamics of such chemical arms race.

**Keywords** PLA<sub>2</sub> inhibitor · Anticoagulation · Venom resistance · Endogenous inhibitors

### Introduction

The co-evolution between competing species (Red Queen dynamics) creates selection pressures that often lead to evolutionary innovations. Constant antagonistic interactions modulate a rapid evolutionary adaptation in related species. This phenomenon is related to distinct ecological interactions, such as host-parasite interactions and venom resistance by predators or prey of venomous snakes (Arbuckle et al. 2017; Barchan et al. 1992, 1995; de Wit and Westrom 1987; Drabeck et al. 2015; Fortes-Dias et al. 1991, 2016; Gibbs et al. 2020; Harris and Fry 2021; Jones et al. 2021; Khan et al. 2020; Lizano et al. 2003; Takacs et al. 2001, 2004; Van Valen 1973).

✉ Bryan Grieg Fry  
 bgfry@uq.edu.au

- <sup>1</sup> Venom Evolution Lab, School of Biological Sciences, The University of Queensland, St. Lucia, QLD 4072, Australia
- <sup>2</sup> Laboratório de Herpetologia, Instituto Butantan, São Paulo, Brazil
- <sup>3</sup> Programa de Pós-Graduação Interunidades Em Biotecnologia, USP, IPT e Instituto Butantan, São Paulo, Brazil
- <sup>4</sup> Instituto de Biotecnología, Universidad Nacional Autónoma de México, Av. Universidad 2001, 62210 Cuernavaca, Morelos, Mexico