

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE
FOSFOLIPASES A₂ ÁCIDAS DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops brazili*

FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

JULIANA CONCEIÇÃO SOBRINHO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E
ESTRUTURAL DE FOSFOLIPASES A₂ ÁCIDAS DO VENENO DA SERPENTE

Bothrops brazili

Dissertação apresentada ao Programa de pós-graduação em Biologia Experimental da Universidade Federal de Rondônia como requisito parcial para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Dr. Andreimar Martins Soares

FICHA CATALOGRÁFICA
BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES

S677i

Sobrinho, Juliana C.

Isolamento e caracterização bioquímica e estrutural de fosfolipases A₂ ácidas do veneno da serpente *Bothrops brazili*. / Juliana C. Sobrinho. Porto Velho, 2014.
80:il

Orientador: Andreimar Martins Soares

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

1. Venenos de serpentes. 2. *Bothrops brazili*. 3. Fosfolipases A₂ ácidas. 4. estrutura primária. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 598.115

Bibliotecária Responsável: Eliane Gemaque / CRB 11- 549

FOLHA DE APROVAÇÃO

Aprovada em: 28 de abril de 2014.

Banca Examinadora:

A handwritten signature in blue ink, reading "Andreimar M. Soares", is written over a horizontal line.

Membro Titular: Dr. Andreimar Martins Soares (FIOCRUZ-RO)

Membro Titular: Dr. Daniel C. Pimenta (Externo- Instituto Butantan)

Membro Titular: Dr. Daniela Priscila Marchi Salvador (Externo - UFPB)

Agradecimentos

Agradeço aos meus pais, João e Mônica, que sempre ajudaram-me a enxergar nos estudos um futuro melhor.

Agradeço ao meu colega de trabalho e esposo, Rodrigo Simões, que com muita paciência e apoio emocional ajudou-me em cada etapa.

Agradeço ao meu orientador, Andreimar Martins Soares, que de maneira generosa me orientou na realização deste trabalho, conduzindo-o com muita responsabilidade.

Agradeço a toda a equipe do CEBio, especialmente ao colega de trabalho e amigo, Anderson Makoto Kayano, que contribuiu em todas as etapas do trabalho e teve muita paciência e generosidade com os meus questionamentos.

Agradeço aos colaboradores, Dr. André e Me. Laura (Universidade Federal Fluminense) e Dr. Saulo (Universidade Federal de São João Del-Rei) pela contribuição.

Agradeço a FIOCRUZ Rondônia, a Universidade Federal de Rondônia e ao Programa de Pós-graduação em Biologia Experimental por tornar o trabalho possível.

E por fim, mas não menos importante, ao suporte financeiro advindo da CAPES, CNPq e FINEP.

RESUMO

ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA E ESTRUTURAL DE FOSFOLIPASES A₂ ÁCIDAS DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops brazili*

A serpente *Bothrops brazili* está distribuída por toda a região amazônica e seu veneno, como nas demais serpentes deste gênero, é rico em proteínas e peptídeos bioativos. As fosfolipases A₂ (PLA₂s, EC 3.1.1.4) são importantes enzimas presentes no veneno de serpentes e estão relacionadas a um amplo espectro de efeitos farmacológicos tais como inflamação aguda, miotoxicidade e nocicepção. O presente trabalho teve como objetivo efetuar o isolamento e a caracterização bioquímica e estrutural de duas novas PLA₂s ácidas do veneno de *B. brazili*, denominadas de Braziliase-I e Braziliase-II. Para tanto, o veneno foi fracionado em três etapas cromatográficas que se mostraram eficientes na purificação: troca iônica, interação hidrofóbica e fase reversa. A homogeneidade e pureza das proteínas foram avaliadas por SDS-PAGE, onde se observou a presença de uma única banda de aproximadamente 14 kDa. As massas moleculares foram determinadas por espectrometria com valores de 13.894,38 Da para Braziliase-I e 13.869,63 Da para Braziliase-II. As estruturas primárias das duas PLA₂s foram determinadas, podendo-se verificar que se tratam de PLA₂s da classe Asp49, sendo observada uma elevada identidade com PLA₂s ácidas isoladas do veneno de outras serpentes. A atividade enzimática foi avaliada utilizando-se o substrato fluorescente NBD-PC e demonstrou que ambas possuem maior atividade entre pHs de 6,8 a 11 e que perdem atividade na temperatura de 80°C e na presença de EDTA. A modelagem molecular das Braziliase-I e II foi feita utilizando-se a PLA₂ CB (3R0L) de *Crotalus durissus terrificus* como modelo. A dinâmica molecular realizada mostrou elevada qualidade no modelo gerado e também fez melhorias em ambos os modelos. Dos resíduos encontrados em regiões desfavoráveis (gráfico de Ramachandran), os mesmos estavam localizados em regiões de elevada flexibilidade. O modelo final foi capaz de adquirir a conformação típica de uma PLA₂ de veneno de serpente. A atividade edematogênica foi realizada em modelo murino com ambas as PLA₂s (Braziliase-I e Braziliase-II) que mostraram ser capazes de promover edema, induzindo um aumento de 27,6% e 22,8% nos primeiros 30 minutos e regredindo logo após. A atividade miotóxica foi avaliada para Braziliase-I e II que demonstraram não serem miotoxinas. Por meio de ensaio de agregação plaquetária detectou-se que ambas as PLA₂s isoladas indicaram apresentar atividade antiplaquetária sobre a agregação induzida por ADP e a Braziliase-II sobre a agregação induzida por colágeno também. Por fim, o isolamento e a caracterização das PLA₂s constituem etapas fundamentais para o estudo da função dessas proteínas na fisiopatologia do envenenamento e na viabilidade destas enzimas como alvos potenciais para pesquisa de novos fármacos de ação antibacteriana, antiplasmodial, antifúngica, antiplaquetária, antitumoral entre outras.

Palavras-chave: Venenos de serpentes, *Bothrops brazili*, fosfolipases A₂ ácidas, estrutura primária, modelagem estrutural por homologia.

ABSTRACT

ISOLATION AND BIOCHEMICAL AND STRUCTURAL CHARACTERIZATION OF ACIDIC PHOSPHOLIPASES A₂ FROM *Bothrops brazili* VENOM

Bothrops brazili is distributed throughout the Amazon region and its venom, as in other snakes of this genus, is rich in proteins and bioactive peptides. Phospholipases A₂ (PLA₂, EC 3.1.1.4) are key enzymes in snake venom and are related to a wide spectrum of pharmacological effects such as acute inflammation, nociception and myotoxicity. This study aimed to isolate and biochemically and structurally characterize two new acidic PLA₂s from the venom of *B. brazili*, called Braziliase-I and Braziliase-II. Thus, the venom was fractionated in three chromatographic steps that have proven effective in purification: ion exchange, hydrophobic interaction and reverse phase. The homogeneity and purity of proteins was assessed by SDS-PAGE, where the presence of a single band of approximately 14 kDa was observed. The molecular weights were determined by spectrometry with values of 13894.38 Da for Braziliase-I and 13869.63 Da for Braziliase-II. The primary structures of the two PLA₂s were determined, and they were confirmed to be part of the Asp49 class of PLA₂s, showing a high identity was observed with acidic PLA₂s isolated from the venom of other snakes. The enzymatic activity was evaluated using the fluorescent NBD-PC substrate, and both have demonstrated increased activity between pH 6.8 to 11 and lose activity at a temperature of 80°C and in the presence of EDTA. Molecular modeling of Braziliase-I and II was performed using CB PLA₂ (3R0L) from *Crotalus durissus terrificus* as a template. The molecular dynamics performed showed high quality in the model generated and also made improvements in both models. All the amino acid residues found in unfavorable regions (Ramachandran chart)–were located in regions of high flexibility. The final model was able to acquire the typical conformation of a PLA₂ from snake venom with a calcium binding loop of two antiparallel α -helices, two short α -helices and two β -sheets. The edema activity was performed in mice with both PLA₂s (Braziliase-I and-II) which proved to be able to promote edema, inducing an increase of 27.6% and 22.8% in the first 30 minutes and regressing soon thereafter. Myotoxic activity was evaluated for Braziliase-I and II revealing that they are not myotoxins. Through the test of platelet aggregation, it was found that both isolated PLA₂s present indicated antiplatelet activity against ADP-induced aggregation and Braziliase-II against collagen-induced aggregation also. Finally, the isolation and characterization of PLA₂ are fundamental steps for the study of the function of these proteins in the pathophysiology of poisoning and the viability of these enzymes as potential targets for the search for new antibacterial, antiparasitic, antifungal, antiplatelet, and antitumor drugs, among others.

Keywords: snake venom, *Bothrops brazili*, acidic phospholipase A₂, primary structure, structural homology modeling.

LISTA DE ABREVIATURAS

2D-SDS-PAGE - Eletroforese Bi-dimensional

ACN – Acetonitrila

AMBIC – Bicarbonato de Amônio

ANOLEA – *Atomic Non-Local Environment Assessment*

ANOVA – Análise de Variância

Asp – Aspartato

BbTX – PLA₂s básicas brazilitoxins

BE-I-PLA₂ – Fosfolipase A₂ isolada do veneno de *B. erythromelas*

BLAST – *Basic Local Alignment Search Tool*

BmooTX-I – Fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *B. moojeni*

Bpir-PLA₂-I – Fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *B. pirajai*

Bp-PLA₂ – Fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *B. pauloensis*

BthA-I PLA₂ – Fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *B. jararacussu*

BthTX - Fosfolipase A₂ isolada do veneno de *B. jararacussu*

CB PLA₂ – Fosfolipase A₂ isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*

CEBio – Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde

CEUA – Comissão de Ética no Uso de Animais

CFR - Cromatografia de Fase Reversa

CGEN – Conselho de Gestão do Patrimônio Genético

CIH - Cromatografia de interação hidrofóbica

CK – Creatina Cinase

COBEA – Colégio Brasileiro de Experimentação Animal

cPLA₂ – Fosfolipases A₂ Citosólicas

Cys – Cisteína

DP – Desvio Padrão

DTT – Ditionotreitól

EDTA – Ácido etilenodiamino tetra-acético

EGTA – Ácido Etileno Glicol Tetracético

Gly – Glicina

His – Histidina

HPLC – *High Performance Liquid Chromatography*

iPLA₂ – Fosfolipase A₂ independente de cálcio

JURKAT – Linhagem de células T leucêmicas humanas

Lys – Lisina

MALDI-TOF – *Matrix-assisted laser desorption/ionization - Time of Flight*.

Mr – Massa molecular relativa

MTX-I – Fosfolipase A₂ básica miotóxica I do veneno de *B. Brazili*

MTX-II – Fosfolipase A₂ básica miotóxica II do veneno de *B. brazili*

NBD-PC – *1-acyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphocholine*

NBD-PA – *1-acyl-2-[6-[(7-nitro-2-1,3-benzoxadiazol-4-yl)amino]hexanoyl]-sn-glycero-3-phosphate*

PAF-AH - Acetil-Hidrolases de Fatores Ativadores de Plaquetas

PBS – Tampão Fosfato em salina

PDB – *Protein DataBank*

pI – ponto isoelétrico

pKa – Constante de dissociação acida

PLA₂ - Fosfolipase A₂

PM – Padrão de massa molecular

RMN – Ressonância Magnética Nuclear

RMSD - Valor do desvio quadrático médio

RMSF – Valores da flutuação média quadrática

SDS-PAGE – Eletroforese em Gel de Poliacrilamida na presença de Sódio Dodecil Sulfato

SPC – *Single Point Charge*

sPLA₂ - Fosfolipase A₂ secretada

TFA – Ácido Triflúor Acético

Tyr – Tirosina

LISTA DE FIGURAS

Figura 01 – Representação de algumas espécies de serpentes peçonhentas de importância médica encontradas no estado de Rondônia.....	15
Figura 02 – Serpente <i>Bothrops brazili</i> , conhecida popularmente como jararaca vermelha.....	17
Figura 03 – Hidrólise de fosfolípido (esquerda) por enzimas PLA ₂ na posição <i>sn</i> -2, e consequente liberação de ácido graxo e lisofosfolípido (direita).....	31
Figura 04 – Perfil cromatográfico do veneno de <i>Bothrops brazili</i> utilizando a cromatografia de troca catiônica.....	33
Figura 05 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% das frações liofilizadas advindas da cromatografia de troca catiônica utilizando o veneno de <i>B. brazili</i>	34
Figura 06 – Perfil cromatográfico das frações 2 e 3 do veneno de <i>Bothrops brazili</i> , advindas da cromatografia de troca catiônica.....	35
Figura 07 – Cromatografia de Fase Reversa evidenciando as duas fosfolipases A ₂ ácidas (respectivamente Braziliase-I e II) do veneno de <i>B. brazili</i> com elevado grau de pureza e SDS-PAGE demonstrando a homogeneidade das enzimas isoladas.....	37
Figura 08 – Eletroforese bidimensional (2D) das PLA ₂ s ácidas isoladas e do veneno bruto de <i>B. brazili</i>	40
Figura 09 – As Fosfolipases A ₂ (PLA ₂ s) ácidas isoladas de venenos botrópicos.....	40
Figura 10 – Espectro de massa em AXIMA TOF ² de Braziliase-I.....	41
Figura 11 – Espectro de massa, em AXIMA TOF ² de Braziliase-II.....	42
Figura 12 – Alinhamento das duas fosfolipases A ₂ isoladas – Braziliase-I e Braziliase-II de <i>B. brazili</i>	43
Figura 13 – Alinhamento das sequências de braziliase-I e braziliase-II com PLA ₂ s de venenos de serpentes e bovina.....	44
Figura 14 – Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácido de Braziliase-I e CB PLA ₂ de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	47
Figura 15 . Alinhamento múltiplo da sequência de aminoácido de Braziliase-II e PLA ₂ CB de <i>Crotalus durissus terrificus</i>	48

Figura 16 – Estrutura tridimensional de PLA ₂ CB de <i>C. d. terrificus</i>	48
Figura 17 – Modelo teórico inicial das estruturas tridimensionais da Braziliase-I e II, respectivamente, de <i>B. brazili</i>	49
Figura 18 – Simulação de Dinâmica Molecular da Braziliase-I e II (esquerda e direita, respectivamente) utilizando o molde CB PLA ₂	50
Figura 19 - Visão da estrutura terciária dos modelos inicial e final da Braziliases-I (esquerda e direita, respectivamente).....	51
Figura 20 - Visão da estrutura terciária dos modelos inicial e final da Braziliases-II (esquerda e direita, respectivamente).....	51
Figura 21 - Gráfico de Ramachandram a partir do modelo teórico de Braziliase-I e II (esquerda e direita, respectivamente).....	53
Figura 22 – RMSF por resíduo após a estabilização da estrutura de Braziliase-I e II. (A): O RMSF do modelo final de Braziliase-I.....	54
Figura 23 - Sobreposição estrutural do modelo final e o molde CB PLA ₂ . A Braziliase-I é mostrada na cor verde e o molde em vermelho.....	55
Figura 24 – Modelo tridimensional das PLA ₂ s ácidas Braziliase-I e II do veneno da serpente <i>B. brazili</i>	56
Figura 25 – Atividade fosfolipásica utilizando as PLA ₂ s isoladas (Braziliase-I e II) e os substratos fluorescentes NBD-PC (fosfatidilcolina) e NBD-PA (ácido fosfatídico).....	57
Figura 26 – Avaliação da atividade enzimática de Braziliase-I e II sobre diferentes de pHs.....	58
Figura 27 – Análise da temperatura de 80°C na atividade enzimática de Braziliase-I e II.....	59
Figura 28 – Análise da influência do Ca ²⁺ na atividade enzimática de Braziliase-I e II.....	60
Figura 29 – Atividade edematogênica das Braziliases I e II e do veneno bruto de <i>Bothrops brazili</i>	61
Figura 31 – Ensaio sobre plaquetas utilizando ADP e colágeno como agonista e as PLA ₂ s isoladas.....	65
Figura 30 – Avaliação da atividade miotóxica de Braziliase-I e II utilizando 50 µg de proteína.....	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 01 – Número de óbitos ocasionados por acidentes ofídicos no Brasil apresentados por regiões e suas respectivas unidades federadas no período de 2000 a 2012.....	13
Tabela 02 – Incidência (100.000 hab) de acidentes ofídicos no Brasil apresentados por regiões e suas respectivas unidades federadas no período de 2000 a 2012.....	14
Tabela 03 – Fosfolipases A ₂ ácidas isoladas com pI similar ao encontrado para as Braziliases-I e II.....	38
Tabela 04 – Identidade da Braziliase-I e II com outras Pla ₂ s do gênero.....	42
Tabela 06 – Resultados do programa ANOLEA e ERRAT para o modelo inicial e final.....	45

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	15
1.1 ACIDENTE OFÍDICO E COMPOSIÇÃO DO VENENO BOTRÓPICO	15
1.2 SERPENTE <i>Bothrops brazili</i>	18
1.3 FOSFOLIPASES A ₂ (PLA ₂) DO VENENO DE SERPENTES	21
2 OBJETIVOS	24
2.1 OBJETIVO GERAL	24
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	24
3 MATERIAL E MÉTODOS	25
3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLA _{2S} ÁCIDAS DO VENENO DA SERPENTE <i>Bothrops brazili</i>	25
3.1.1 Cromatografia de troca catiônica	25
3.1.2 Cromatografia de interação hidrofóbica	25
3.1.3 Cromatografia líquida em coluna de fase reversa	26
3.1.4 Eletroforese em gel de Poliacrilamida	26
3.1.5 Espectrometria de massa	26
3.1.6 Eletroforese Bi-dimensional de proteínas (2D-SDS-PAGE)	27
3.2.1.2 Redução e Alquilação	27
3.2.1.3 Digestão da proteína.....	27
3.2.1.4 Sequenciamento “ <i>De novo</i> ”	28
3.2.2 Estudo da sequência primária e similaridade	28
3.2.3 Modelagem por homologia estrutural	28
3.2.4 Dinâmica molecular.....	29
3.2.5 Análise estrutural e Validação	30
3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA SOBRE FOSFOLIPÍDIOS FLUORESCENTES	30
3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS.....	31
3.4.1 Avaliação da atividade edematogênica	31
3.4.2 Avaliação da atividade miotóxica	31
3.4.3 Ensaio sobre a agregação plaquetária	31
3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	32
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO	33
4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLA _{2S} ÁCIDAS DO VENENO DA SERPENTE <i>B. brazili</i>	33

4.1.1 Isolamento das PLA ₂ s	33
4.1.2 Eletroforese bidimensional	41
4.1.3 Espectrometria de massa	44
4.1.4 Determinação da estrutura primária e estudos de similaridade	46
4.1.5 Modelagem Molecular por Homologia e Dinâmica Molecular	48
4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA SOBRE FOSFOLIPÍDIOS FLUORESCENTES	58
4.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL	61
4.3.1 Atividade edematogênica	61
4.3.2 Avaliação da atividade miotóxica	63
4.3.3 Ensaio sobre Plaquetas	66
5 CONCLUSÃO	69
REFERÊNCIAS	70

1 INTRODUÇÃO

1.1 ACIDENTE OFÍDICO E COMPOSIÇÃO DO VENENO BOTRÓPICO

Os acidentes ofídicos representam um importante problema de saúde pública, sendo que em todo o mundo mais de 5 milhões de indivíduos são acometidas por acidentes ofídicos por ano, causando de 25.000-125.000 óbitos e um número de aproximadamente 400.000 indivíduos com sequelas permanentes (GUTIÉRREZ et al., 2013). No Brasil o número de óbitos por acidentes ofídicos tem aumentado a cada ano, passando de 57 em 2000 para 1.379 em 2012. Somente no período de 2004 a 2009, o número de acidentes teve um aumento de 32,7% (ALBUQUERQUE et al., 2013). A região norte apresenta o maior número de casos de acidentes ofídicos no país, mesmo possuindo uma densidade populacional menor do que as demais regiões. Apenas no estado de Rondônia, no período de 2000 a 2012, foram notificadas 21 mortes, sendo a incidência de 29,4 (por 100.000 habitantes), um dos mais elevados do país (BRASIL, 2013).

No Brasil, a partir de 1986, o Ministério da Saúde tornou obrigatória a notificação dos acidentes por animais peçonhentos a fim de aprimorar as condições de atendimento e tratamento dos acidentados. No entanto, os dados sobre o número de acidentes ofídicos são, em muitos casos, subestimados, pois, um número indeterminado de pacientes não são atendidos em centros de saúde (FISZON, J. T e BOCHNER, 2008; GUTIÉRREZ, 2011). Os acidentes ofídicos afetam predominantemente trabalhadores de áreas rurais, principalmente homens em idade produtiva e de baixo poder aquisitivo, sendo os membros inferiores os locais mais atingidos (75% dos casos) (BOCHNER e STRUCHINER, 2003). Nestas regiões, além da disponibilidade limitada de soros antiofídicos, as instalações de saúde são muito distantes, o que aumenta o tempo para o atendimento da vítima. Em virtude desse perfil, a Organização Mundial da Saúde (OMS), em 2009, reconheceu o acidente ofídico como uma condição negligenciada (WHO, 2009).

De acordo com estudo recente da Sociedade Brasileira de Herpetologia existem 386 espécies de serpentes (BÉRNILS e COSTA, 2012). Dessas, 55 espécies são consideradas peçonhentas (ARAÚJO, SANTALÚCIA e CABRAL, 2003; BERNARDE, 2011). As serpentes clinicamente relevantes no Brasil pertencem aos gêneros botrópicos (*Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias*), *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (SGRIGNOLLI et al., 2011). Em Rondônia, representantes dos quatro grupos (**Figura 01**) foram responsáveis pela média de 673 casos de acidentes por ano no período de 2009 a 2011 (BERNARDE, ALBUQUERQUE e TURCI, 2012).



Figura 01 – Representação de algumas espécies de serpentes peçonhentas de importância médica encontradas no estado de Rondônia. Os símbolos grafados identificam os locais onde as espécies foram registradas, sendo destacadas as microrregiões correspondentes a: Porto Velho 1 (vermelho), Guajará-mirim 2 (verde), Ariquemes 3 (cinza), Ji-paraná 4 (cinza), Alvorada d'Oeste 5 (amarelo), Cacoal 6 (marrom), Colorado do Oeste 7 (amarelo) e Vilhena 8 (azul).
 FONTE: Imagens e texto adaptados de Bernarde e colaboradores (2012).

O gênero *Bothrops* (conhecido popularmente como jararaca, jararacuçu, urutu, caiçaca) representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas sendo responsável pela maior parte dos acidentes, fato que se relaciona com a abundância em

que é encontrada e com a sua distribuição geográfica na região Sul Americana (BOCHNER e STRUCHINER, 2003).

No Brasil, as espécies peçonhentas mais frequentemente encontradas (por região) são as seguintes: *Bothrops atrox*: encontrada na Amazônia; *Bothrops erythromelas*: abundante nas áreas litorâneas e úmidas da região Nordeste; *Bothrops jararaca*: coloniza áreas silvestres, agrícolas e periurbanas, sendo a espécie mais comum da região Sudeste; *Bothrops jararacussu*: predominante no Sul e Sudeste; *Bothrops moojeni*: principal espécie dos cerrados; e *Bothrops alternatus*: vive em campos e outras áreas abertas, desde a região Centro-oeste até a Sul (BERNARDE, ALBUQUERQUE e TURCI, 2012).

O veneno de serpente possui cerca de 90% do peso seco em proteínas, sendo que grande parte desta é constituído de enzimas como fosfolipases A₂ (PLA₂), proteases, L-aminoácido oxidase, hialuronidases, entre outras. As frações não-protéicas são representadas por carboidratos, lipídeos, amins biogênicas, nucleotídeos, aminoácidos livres e íons inorgânicos como cálcio, ferro, cobre, potássio, fósforo, cobalto e zinco. Esta composição rica em moléculas bioativas tem uma função primordial de digestão e paralisia de presas ou vítimas (CALVETE, JUÁREZ e SANZ, 2007; CALVETE et al., 2009).

Os envenenamentos causados por serpentes do gênero *Bothrops* são caracterizados por uma fisiopatologia complexa que se apresenta por alterações no local da mordida e por distúrbios sistêmicos. Quanto às alterações locais, verifica-se um quadro caracterizado por mionecrose, hemorragia e edema (inflamação aguda) e tem como consequência um dano tecidual que frequentemente resulta em sequelas permanentes no indivíduo atingido (LOMONTE e GUTIÉRREZ, 1989; FRANÇA e MÁLAQUE, 2003). Além disso, há manifestações sistêmicas como alterações cardiovasculares (especialmente hemorragia), desordens da coagulação e alterações renais (TEIXEIRA et al., 2003; 2005; BONAVITA et al., 2006). Os sintomas observados no envenenamento botrópico são atribuídos aos componentes do veneno que podem agir de forma isolada ou sinérgica. A ação miotóxica é associada a miotoxinas com estrutura de fosfolipases A₂ que agem sobre a membrana plasmática de células musculares, e também por metaloproteases que provocam degeneração e isquemia (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; LOMONTE e RANGEL, 2012). Além da miotoxicidade, as PLA₂s do veneno botrópico promovem reação inflamatória caracterizada pelo aumento da permeabilidade microvascular e a consequente formação

de edema, o recrutamento de leucócitos em tecidos e nocicepção. Elas são enzimas chaves na liberação de ácido araquidônico, o substrato para a biossíntese de vários mediadores lipídicos a inflamação, tais como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos (TEIXEIRA et al., 2003; 2005; ZULIANI et al., 2005; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2013).

O quadro hemorrágico é outra característica observada no envenenamento botrópico estando associado à atividade das metaloproteases do veneno. No envenenamento, estas enzimas proteolíticas atuam sobre a matriz extracelular e membrana basal de células endoteliais dos capilares sanguíneos desenvolvendo lesões por meio das quais eritrócitos e outros componentes do sangue extravasam para o espaço intersticial (BJARNASON e FOX, 1994; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000).

Apesar da composição do veneno ser nociva para vítimas e presas, o seu conteúdo tem sido alvo de inúmeros estudos farmacológicos. Com o advento da biotecnologia, a importância terapêutica tem sido descoberta e analisada após a purificação e caracterização de moléculas do veneno (SOARES e GIGLIO, 2003; ALOULOU et al., 2012; VYAS et al, 2013).

1.2 SERPENTE *Bothrops brazili*

O primeiro relato científico identificando a espécie *Bothrops brazili* foi publicado na revista Memórias do Instituto Butantan por HOGE em 1953 no trabalho intitulado “A new *Bothrops* from Brazil, *Bothrops brazili*, sp. nov.”. O nome “*brazili*” foi atribuído em homenagem ao pesquisador Dr. Vital Brazil, pioneiro na produção de soro antiofídico no Brasil. A serpente peçonhenta *B. brazili* pertencente à família Viperidae, subfamília Crotalinae, sendo conhecida popularmente como “jararaca vermelha” (**Figura 2**).

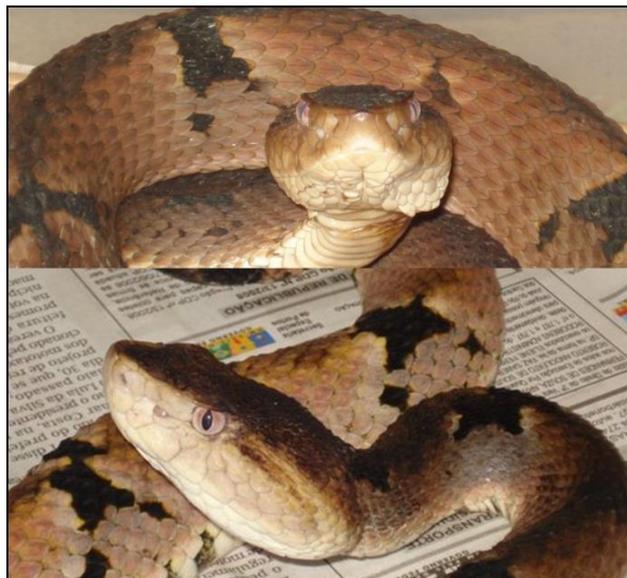


Figura 2 – Serpente *Bothrops brazili*, conhecida popularmente como jararaca vermelha. Foto: Breno de Almeida (acervo particular).

A serpente *B. brazili* está distribuída na América do Sul onde é encontrada no Brasil, Colômbia, Equador, Guiana, Peru, Suriname e Guiana Francesa (CAMPBELL e LAMAR, 1989). No Brasil é amplamente distribuída na Amazônia, porém não é uma espécie frequente, sendo considerada rara. Possui tamanho médio de aproximadamente 1,2m de comprimento, encontrada principalmente na floresta primária, sendo uma espécie terrícola, possui atividade noturna e alimenta-se de roedores, anuros, lagartos e lagartixas. Uma das características particulares dessa serpente é o elevado volume de veneno que consegue injetar, se comparada as demais serpente do gênero, podendo alcançar até 4 mL por picada (ZVALETA, 1992; ESCOBAR, RODRIGUEZ e YARLEQUE, 1996; BERNADE, ALBUQUERQUE e TURCI, 2012).

O elevado número de casos de envenenamentos provocados por *B. brazili* na Guiana, Guiana Francesa e Suriname destacaram esta serpente como espécie de relevância médica (GUTIÉRREZ, 2011).

Existem poucos estudos publicados envolvendo *B. brazili* e o seu veneno. Solís e colaboradores (1999) foram os primeiros a estudarem o veneno desta espécie de serpente, descrevendo a purificação de uma L-aminoácido oxidase e sua atividade biológica contra cepas bacterianas de *Staphylococcus aureus*, *Vibrio cholerae* e *Streptococcus faecalis*.

Pantigoso e colaboradores (2001, 2002) reportam a presença e a caracterização parcial de uma miotoxina do veneno da espécie. A miotoxina possui massa molecular de 30 kDa formada por duas cadeias polipeptídicas de 15kDa e não apresentou atividade

enzimática. A inoculação da mesma no músculo gastrocnêmio de camundongo produz necrose do tecido, revelada pela liberação de creatina quinase e lactato desidrogenase, hipercontração e o incremento dos níveis de cálcio intramuscular.

Do veneno de *B. brazili*, Isla, Málaga e Yarlequé (2003) purificaram uma protease com ação hemorrágica e caracterizaram sua ação A α -fibrinogenase.

Em 2008, Costa e colaboradores reportaram a purificação e caracterização de duas PLA₂s básicas miotóxicas do veneno denominadas MTX-I (cataliticamente ativa) e MTX-II (cataliticamente inativa). Ambas foram purificadas por único passo cromatográfico em coluna CM-Sepharose (cromatografia de troca iônica). Peptídeos sintéticos derivados das MTXs apresentaram citotoxicidade sobre a linhagem de células T leucêmicas humanas (JURKAT), *Escherichia coli*, *Candida albicans* e *Leishmania sp.*

Em 2009, Huancahuire-Vega e colaboradores isolaram as PLA₂s básicas brazilitoxins II e III (BbTX-II and III), miotoxinas isoladas a partir do veneno da serpente *B. brazili*. As brazilitoxins foram purificadas por apenas um passo cromatográfico por meio da cromatografia de fase reversa em coluna C18. Quanto à atividade biológica, ambas as toxinas apresentaram atividade miotóxica, edematogênica e foram capazes de promover o bloqueio da transmissão neuromuscular.

Em 2012, foram publicados as primeiras estruturas cristalizadas e análise preliminar de difração de raios X das PLA₂s Lys49 BbTX-II e MTX-II (provavelmente MTX-II) e da BbTX-III, Asp49, de *B. brazili*. As estruturas das Lys49 apresentaram conformação dimérica, inclusive em solução, e a Asp49 apresentou estrutura monomérica, indicando agir nesta forma *in vivo* (FERNANDES et al., 2012).

No primeiro semestre de 2013, foi publicado por Marcussi e colaboradores, um trabalho que apresenta o efeito genotóxico do veneno das serpentes do gênero *Bothrops* e toxinas isoladas sobre o DNA de linfócitos humanos. Neste trabalho, o veneno de *B. brazili* foi capaz de induzir quebras no DNA de linfócitos humanos em concentrações de até 5 $\mu\text{g/mL}$, demonstrando potencial genotóxico.

O mais recente trabalho publicado (2013), foi o de Fernandes e colaboradores (2013) que por meio da análise comparativa das estruturas entre as Lys49 BbTX-II e MTX-II e outras Lys49 botrópicas propôs uma hipótese para explicar o mecanismo que promove a ação miotóxica desencadeada por elas. A hipótese se baseou em 5 ações: ligação aos ácidos graxos; alterações oligoméricas; acoplamento da proteína a

membrana; desestabilização da membrana pela penetração de resíduos hidrofóbicos e finalmente o influxo descontrolado de íons com a consequente morte celular.

Apesar dos estudos realizados utilizando o veneno da serpente *B. brazili* acima descritos, seu conteúdo pode ser considerado pouco explorado, evidenciando a necessidade de maiores estudos para uma melhor compreensão do papel de seus componentes no processo de envenenamento, bem como para um maior aproveitamento de seu potencial biotecnológico.

1.3 FOSFOLIPASES A₂ (PLA₂) DO VENENO DE SERPENTES

Nos últimos 30 anos, observou-se um aumento substancial no conhecimento sobre a superfamília das enzimas PLA₂s. Elas compreendem uma grande classe de proteínas que catalisam a hidrólise na posição *sn*-2 de fosfolipídios em ácidos graxos e lisofosfolipídeos (**Figura 3**) (SIX e DENNIS, 2000). Os ácidos graxos liberados, como os ácidos araquidônico e o oleico, são importantes como estoque de energia, porém o ácido araquidônico pode funcionar como segundo mensageiro e como precursor de eicosanoides, que são potentes mediadores da inflamação e transdução de sinal, estando envolvido em uma ampla variedade de efeitos fisiológicos e patológicos. Os lisofosfolipídios são importantes na sinalização celular, remodelamento de fosfolipídios, podem ser catalisados por fatores ativadores de plaquetas e desencadeiam perturbação na membrana, podendo agir como agente hemolítico. (BURKE e DENNIS, 2009; DENNIS et al., 2011). Devido a sua importante participação em muitos processos celulares, inclusive funções regulatórias no organismo e no interior das células, as PLA₂s tem sido extensivamente estudadas e relacionadas com algumas doenças como artrite, aterosclerose, Alzheimer e asma.

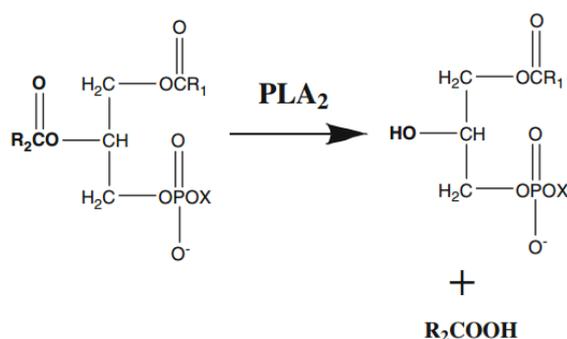


Figura 03 – Hidrólise de fosfolipídio (esquerda) por enzimas PLA₂ na posição *sn*-2, e consequente liberação de ácido graxo e lisofosfolípido (direita).

Fonte: Burke e Dennis, 2009.

Baseado na sequência de aminoácidos, massa molecular, padrão de pontes de dissulfeto, necessidade de Ca^{2+} , origem, dentre outras características, as PLA_2s são classificadas em 15 grupos e seus subgrupos que incluem cinco tipos distintos de enzimas: as denominadas PLA_2s secretadas (sPLA_2), as citosólicas (cPLA_2), as independentes de Ca^{2+} (iPLA_2), as acetil-hidrolases fator ativador de plaquetas (PAF-AH), e as lisossomais (SCHALOSKE e DENNIS, 2006; BURKE e DENNIS, 2009; DENNIS et al., 2011).

As PLA_2s secretadas foram as primeiras enzimas do tipo de PLA_2 descobertas e compartilham características como a baixa massa molecular (13-15 kDa), um sítio ativo formado pela presença de uma Histidina na posição 48 (His-48) e um Ácido Aspártico na posição 99 (Asp-99), necessidade de Ca^{2+} para atividade catalítica e seis pontes de dissulfeto conservadas com uma ou duas variáveis. Podem ser encontradas a partir de diversas fontes, tais como: venenos de moluscos, artrópodes, serpentes, componentes do suco pancreático, fluido sinovial de artrite e em diversos tecidos de mamíferos (SIX e DENNIS, 2000; BURKE e DENNIS, 2009).

As PLA_2s dos venenos de serpentes são enzimas secretadas pertencentes aos grupos IA (Hydrophiidae e Elapidae) e IIA (Crotalidae e Viperidae). As PLA_2s dos venenos da família Viperidae (inclui gênero *Bothrops*) têm sido subdivididas em dois grupos principais: as Asp-49, cataliticamente ativas e as Lys-49, cataliticamente inativas. As PLA_2 Asp-49 apresentam um sítio de ligação de cálcio que é constituído pelo grupo β -carboxílico do resíduo Asp-49 e os grupos $\text{C}=\text{O}$ carbonílicos dos resíduos Tyr-28, Gly-30 e Gly-32. A presença de duas moléculas de água estruturalmente conservadas completa a esfera de coordenação do Ca^{2+} formando uma pirâmide pentagonal. Desta forma, a substituição do resíduo Asp-49 por Lys-49 altera significativamente o sítio de ligação de Ca^{2+} nas fosfolipases A_2 , impedindo a ligação deste íon e resultando em baixa ou inexistente atividade catalítica. Portanto, o resíduo Asp-49 é de fundamental importância para o mecanismo catalítico das fosfolipases A_2 (ARNI et al., 1996; SOARES et al., 2000, 2004; BURKE e DENNIS, 2009; DOS SANTOS et al., 2009).

A maioria das fosfolipases A_2 descritas para o gênero *Bothrops* são proteínas básicas, com ponto isoelétrico (pI) entre 7-10, apresentando ou não atividade catalítica, além de diversos efeitos farmacológicos, tais como: miotoxicidade, atividade edematogênica e ação anticoagulante (SOARES et al., 2004; LOMONTE et al., 2012). Por outro lado, as PLA_2s ácidas presentes no veneno de serpentes do gênero *Bothrops* foram pouco estudadas e pouco se sabe sobre os efeitos fisiopatológicos desencadeados

por estas enzimas (ANDRILAO-ESCARSO et al., 2002; FERNANDEZ et al., 2010; SILVEIRA et al., 2012).

A caracterização físico-química de componentes proteicos do veneno, também chamada venômica, tem revelado que as PLA₂s constituem cerca de 30-60% do veneno de algumas espécies de serpentes. A proporção de PLA₂s ácidas e básicas é variável para cada espécie, contudo, na maioria das serpentes botrópicas, o conteúdo de PLA₂s ácidas é menor do que o das básicas, sendo este um dos fatores para o menor número de trabalhos publicados. Essas múltiplas isoformas foram geradas pela duplicação de genes e evolução acelerada de éxons que culminaram em modificações principalmente em aminoácidos da superfície dessas moléculas e permitiu o desenvolvimento de novas funções. As isoformas básicas parecem ter adquirido a toxicidade mais elevada, especialmente no caso de enzimas neurotóxicas e miotóxicas (CALVETE, JUÁREZ e SANZ, 2007).

Até a presente data, todas as PLA₂s ácidas purificadas a partir de venenos de serpentes viperídeas apresentam um resíduo de Asp na posição 49, porém nem todas as PLA₂ Asp49 são ácidas. Estas isoformas ácidas geralmente têm uma atividade catalítica mais elevada do que PLA₂s básicas. Apesar disso, muitas PLA₂s ácidas não são letais ou mostram uma potência letal fraca em camundongos, outras exibem atividade miotóxica, hipotensora, de bloqueio neuromuscular e de inibição da agregação plaquetária (FERNÁNDEZ, et al., 2013). Mesmo considerando todas as publicações científicas, as potenciais atividades tóxicas das PLA₂s permanecem pouco conhecidas, e por conseguinte, suas possíveis funções na fisiopatologia do envenenamento também o são. Um número muito pequeno dos venenos de serpentes viperídeas tiveram PLA₂s ácidas caracterizadas e no caso do veneno de *B. brazili* até o momento não há nenhum estudo publicado caracterizando tais proteínas.

Por todo o exposto, o isolamento e a caracterização bioquímica e estrutural de PLA₂s ácidas do veneno de *B. brazili* poderão gerar informações importantes para o melhor entendimento dos efeitos farmacológicos ocasionados por estas proteínas.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente trabalho teve como objetivo o isolamento e a caracterização bioquímica e estrutural de fosfolipases A₂ ácidas do veneno da serpente *Bothrops brazili*.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar duas fosfolipases A₂ ácidas do veneno de *B. brazili*;
- Caracterizar físico-quimicamente as duas PLA₂s isoladas: determinação da massa molecular, ponto isoeletrico, estrutura primária e estrutura terciária;
- Caracterizar a atividade enzimática: afinidade de substrato, influência do pH, cálcio e temperatura;
- Caracterização farmacológica: ensaios de edema, miotoxicidade e ensaio sobre agregação plaquetária;

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLA₂S ÁCIDAS DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops brazili*

O veneno da espécie *Bothrops brazili* foi adquirido do Serpentário Proteínas Bioativas Ltda, Batatais-SP e mantido refrigerado (8°C) no Banco de Venenos Amazônicos no Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde, CEBio-UNIR-FIOCRUZ-RO, (autorização: CGEN/CNPq 010627/2011-1 e IBAMA 27131-2).

No presente trabalho, a utilização de animais (camundongos) para experimentação esteve de acordo com Princípios Éticos de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais FIOCRUZ/RO (CEUA/RO) sob o número 2013/07 (Anexo 01), bem como o uso de material humano foi aprovado no Conselho de Ética em Pesquisa (CAAE: 14204413.5.0000.0011).

3.1.1 Cromatografia de troca catiônica

Aproximadamente 40 mg do veneno bruto dessecado de *B. brazili* foi suspenso em 1 mL de tampão bicarbonato de amônio (NH₄HCO₃ - AMBIC) 50 mM pH 8,0 e centrifugado à 3.000xg por 5 minutos para retirada do material insolúvel. O veneno foi fracionado em uma coluna CM-Sepharose FF[®] (1 x 40 cm), cuja matriz é composta de agarose e o grupo funcional de Carboximetil (OCH₂COO⁻), previamente equilibrada com o mesmo tampão usado para solubilizar o veneno e a amostra eluída sob gradiente de 0 a 100% de AMBIC 500 mM pH 8,0, em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/minuto, em sistema de cromatografia *Akta Purifier* (GE). A eluição foi monitorada em 280 nm e as frações coletadas manualmente.

3.1.2 Cromatografia de interação hidrofóbica

Depois de liofilizadas, as frações 2 e 3 (frações ácidas) obtidas da cromatografia de troca catiônica foram unidas e submetidas a um segundo passo cromatográfico – de interação hidrofóbica – em coluna n-butyl-Sepharose-HP[®] (1 x 15cm), cuja matriz é composta de agarose. Para tanto, as frações foram solubilizadas em tampão A (AMBIC 20 mM + NaCl 4 M), e eluídas sob um gradiente segmentado constituído por 0, 25, 50, 75 e 100% de tampão B (AMBIC 20mM) e uma última etapa utilizando apenas água

deionizada, sob fluxo de 2,5 mL/min. A eluição das proteínas foi monitorada em 280 nm.

3.1.3 Cromatografia líquida em coluna de fase reversa

A fração 6 advinda da cromatografia de interação hidrofóbica foi liofilizada e solubilizada em TFA 0,1% (Solução A) e submetida a cromatografia líquida de alta performance (HPLC) em coluna C18 (25 x 4.6 mm - Supelco) previamente equilibrada com a solução A e eluída sob gradiente de 0 a 70% de solução B (acetonitrila 99,9% e TFA 0,1%) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/min. A eluição foi monitorada em 280nm.

3.1.4 Eletroforese em gel de Poliacrilamida

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5 % (m/v) na presença de SDS (SDS-PAGE), foi realizada em sistema descontínuo de pH, em condições redutoras e não redutoras, foi realizado conforme descrito por (LAEMMLI, 1970). O gel foi fixado em solução aquosa de metanol 40 % (v/v) e ácido acético 7 % (v/v) por 30 minutos. As bandas de proteínas foram evidenciadas através da imersão em solução contendo *Coomassie Brilliant Blue G-250*[®] 0,08 % (m/v), sulfato de alumínio 8,0 % (m/v), ácido o-fosfórico 1,6 % (m/v) e metanol 20,0 % (v/v) pelo período de 2 horas. O excesso de corantes foi retirado por imersão em solução descorante contendo etanol 4,0 % e ácido acético 7,0 % (v/v) em água. Várias trocas desta solução foram realizadas até a obtenção de gel com coloração adequada. A imagem dos géis foi obtida com uso de equipamento *Image scanner*[®] (GE Healthcare Lifesc.) e a massa molecular relativa (*Mr*) determinada com uso do programa *IQTL*[®] (GE Healthcare Lifesc) comparando-se as distâncias relativas de migração das amostras e dos padrões de massa molecular.

3.1.5 Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi realizada em equipamento de MALDI (dessorção assistida por ionização da matriz a laser), com dois analisadores TOF (AXIMA TOF² Shimadzu Biotech), operando em modo linear e utilizando solução saturada de ácido sinapínico como matriz de ionização e 1µg de proteína (proporção 3:1, respectivamente) A massa molecular das amostras foram determinadas por comparação com padrões externos de proteínas.

3.1.6 Eletroforese Bi-dimensional de proteínas (2D-SDS-PAGE)

A eletroforese bidimensional foi realizada conforme descrito por da Silva (2012). Brevemente, a amostra foi solubilizada em solução de rehidratação contendo uréia 7 M, tiourea 2 M, CHAPS 2,0 % (m/v), *immobilized pH gradient buffer (IPG buffer®)* 0,5 % (v/v) e azul de bromofenol 1,0 % (m/v); e aplicadas sobre tiras de poliacrilamida de 7cm com gradiente de pH de 7,0 a 13,0 imobilizado de forma não linear (*Immobiline DryStrip®*). A focalização isoeétrica foi realizada no *IPGphor III System (GE Healthcare Life Scienc.)* de acordo com as instruções do fabricante. Após a focalização isoeétrica, a amostra foi reduzida e alquilada e a tira posicionada na porção superior de gel de SDS-PAGE 12,5 % (m/v) para realização da segunda dimensão (15 mA, 90 minutos). O gel foi fixado, corado e descorado conforme descrito anteriormente. A imagem do gel foi obtida com auxílio de um *Image Scanner III®* e analisada com auxílio do *software IQTL (GE Healthcare Life Science)*.

3.2 CARACTERIZAÇÃO ESTRUTURAL DE DUAS PLA_{2s} ÁCIDAS DO VENENO DE *Bothrops brazili*

3.2.1 Determinação da estrutura primária

3.2.1.1 Sequenciamento de aminoácidos por Degradação química de Edman

O sequenciamento da estrutura primária das duas PLA_{2s} isoladas do veneno de *B. brazili* foi realizado em microsequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu), o qual utiliza o processo químico de sequenciamento por clivagem N-terminal, derivado do método desenvolvido por Pehr Edman conforme descrito por Gray (1972).

3.2.1.2 Redução e Alquilação

As proteínas foram reduzidas por tratamento com solução de ditioneitol (DTT) 20 mM em AMBIC 50 mM, por período de 1 hora a 30°C. Para alquilação dos grupos tiol dos resíduos de cisteína, a proteína reduzida foi incubada com iodoacetamida 150 mM em bicarbonato de amônio 50 mM por 1 hora, a 30°C e ao abrigo da luz.

3.2.1.3 Digestão da proteína

As amostras foram previamente reduzida e alquilada, conforme descrito anteriormente, foi submetida a digestão com uso de tripsina modificada (*Sequencing grade modified®*), por período de 18 horas, a 37°C e ao abrigo da luz. O excesso de reagentes e eletrólitos foi retirado com uso de resina C-18 (*Proxeon Stage tip®*) e

eluídas com acetonitrila (ACN) 70 % e TFA 0,1 % (v/v). As amostras foram liofilizadas e solubilizadas em ácido fórmico 1 % (m/v).

3.2.1.4 Sequenciamento “*De novo*”

A análise espectrométrica foi realizada em um NanoAcquity (Waters) HPLC acoplado ao espectrômetro OrbitrapVelos (Thermo Scientific). Uma alíquota do digesto trípico foi injetada e separada em coluna C18 (75 μ m Oi, 10 cm, nano Acquity, 1,7 μ m BEH column, Waters). Os peptídeos foram eluídos com o seguinte gradiente: 1 a 40 % B em 20 minutos, seguido por gradiente de 40 % a 60 % de B em 5 minutos sob fluxo de 250 nL/minuto. A solução A continha de ácido fórmico 0,1 % (v/v) em água e a solução B ácido fórmico 0,1 % (v/v) em acetonitrila. A massa dos peptídeos (m/z: 300 – 1700) foram medidos no Orbitrap à resolução de 60.000 a m/z 400. Os peptídeos mais abundantes foram selecionados e fragmentados em célula de colisão HCD com energia de colisão normalizada (NCE) de 40 % com nitrogênio sendo usado como gás de colisão. Os fragmentos foram detectados no Orbitrap com resolução de 7500FWHM a 400 m/z. Os dados foram coletados com Thermo Xcalibur (v.2.1.0.1140). Este experimento foi realizado em colaboração com a Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos.

3.2.2 Estudo da sequência primária e similaridade

Após a obtenção das sequências parciais das duas PLA₂s ácidas de *B. brazili*, foi realizado busca por similaridade com o algoritmo BLAST e o alinhamento múltiplo utilizando-se o programa Clustal W disponível em <http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>.

3.2.3 Modelagem por homologia estrutural

O modelo tridimensional inicial das PLA₂s foram gerados pela técnica de modelagem por homologia estrutural (CHOTHIA e LESK, 1986; BOWIE et al., 1991; GODZIK et al., 1992; JONES et al., 1992; HOLM e SANDER, 1993; HOLM e SANDER, 1995), implementado no servidor HHPred. Para tanto, a estrutura primária das proteínas foram avaliadas quanto à identidade dos resíduos de aminoácidos e os resíduos que não puderam ser identificados pelas metodologias descritas foram

definidas utilizando-se como critério a conservação quando comparadas à outras PLA₂s ácidas de venenos botrópicos. Para a uma das PLA₂ isoladas (Braziliase-I), a exceção foi o resíduo 63 (**X**) para o qual foram realizadas avaliações com substituições por isoleucina, serina, treonina ou valina. Após a geração dos modelos, os estudos foram realizados com a sequência que incorporava a valina, devido à melhor qualidade nos modelos (resíduos com alto valor energético e localizados em regiões desfavoráveis (*outliers*) pelo gráfico de Ramachandran que foram menores que nos modelos gerados com os outros aminoácidos). Os modelos de ambas as PLA₂s isoladas foram gerados empregando-se a estrutura cristalizada da CB PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* (PDB ID: 3R0L). Este experimento foi realizado em colaboração com a Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos.

3.2.4 Dinâmica molecular

Após a obtenção do modelo tridimensional inicial das PLA₂s isoladas, foi realizada uma simulação de dinâmica molecular (DM) com o intuito de refinar as estruturas obtidas. As simulações de DM foram realizadas empregando o programa GROMACS 4.5.4 (BERENDSEN et al., 1995; LINDAHL et al., 2001) em um processador Intel Xeon com 8GB de RAM, operando no sistema operacional Linux CentOS 5.5. Foi empregado o modelo de solvatação explícita utilizando o modelo de água *Single Point Charge* (SPC) (BERENDSEN et al., 1981) para representar as moléculas de água. Os estados de protonação dos grupos carregados foram ajustados de acordo com pH 7,0 e contra-íons foram adicionados para neutralizar o sistema. O campo de força Gromos (van GUNSTEREN et al., 1996), uma caixa periódica cúbica com distância mínima de 1nm entre todos os átomos da proteína e as paredes da caixa e pressão e temperatura constantes foram empregados para a realização das simulações de DM. A partir da estrutura inicial das proteínas com as configurações mencionadas, foi realizada uma minimização de energia utilizando o algoritmo *steepest descent*. A seguir, foi realizada uma dinâmica de 20ps mantendo as posições dos átomos da cadeia principal restritas à 300 K para relaxar o sistema. Este experimento foi realizado em colaboração com a Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos.

3.2.5 Análise estrutural e Validação

Após a simulação DM, diversas ferramentas de análise estrutural contidas no pacote GROMACS foram empregados para avaliar o modelo 3D final das PLA₂s isoladas. Também foram utilizados outros métodos de validação, tais como um perfil de pseudo-energia, que foi analisado com Verifeye 3D e PROSA-web, assim como o gráfico de Ramachandran, ERRAT programa o servidor web ANOLEA e servidor SolvX. Este experimento foi realizado em colaboração com a Universidade Federal de São João Del-Rei, Campus Alto Paraopeba, Departamento de Química, Biotecnologia e Engenharia de Bioprocessos.

3.3 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA SOBRE FOSFOLIPÍDIOS FLUORESCENTES

Os fosfolipídios fluorescentes NBD-PC e NBD-PA foram inicialmente reconstituídos em 200µL de clorofórmio 100% e posteriormente secado sobre um baixo fluxo de N₂. Depois de secos, os fosfolipídios foram solubilizados em NaCl 0,5M. Uma solução estoque de 1mg/mL foi preparada e o volume de 10µL foi utilizado para cada ensaio, junto com 500µL de CaCl₂, 100µL de Tris-HCl 20mM pH7,5 e 10µL da amostra em diferentes quantidades finais (0,025; 0,05 e 0,1µg). O volume final em todos os experimentos foi sempre ajustado para 3mL. Para avaliação da influência do pH, foram utilizados 100µL dos tampões tampões: acetato 0,1M (pH 3,5), acetato 0,1M (pH 4,5), acetato 0,1M (pH 5,5), Tris-HCl 1M (pH 6,8), Tris-HCl 1M (pH 7,5), Tris-Base 1M (pH 8,5) e Tris-Base 1M (pH 11). As amostras foram previamente incubadas com o meio reacional por 5min a temperatura ambiente e depois foi adicionado o substrato. Para o ensaio da termoestabilidade foi testado apenas uma temperatura, a de 80°C, as amostras diluídas em água miliq foram incubadas por 5min e depois submetidas ao meio reacional com o substrato. Para a investigação da influência do Ca²⁺ na atividade enzimática, em um experimento não houve a adição do CaCl₂, completando-se o volume final de 3mL com água miliq e em outro experimento este mesmo procedimento foi repetido, porém adicionou-se 150 µL de EDTA 0,1M. Em todos os experimentos houve a leitura em fluorímetro (Shimadzu® modelo RF-5301pc). Este experimento foi realizado em colaboração com o laboratório Laboratório de Venenos e Toxinas Animais e Avaliação de Inibidores (LAVENOTOX) da Universidade Federal Fluminense (UFF).

3.4 ATIVIDADES BIOLÓGICAS

3.4.1 Avaliação da atividade edematogênica

Camundongos *Swiss* (26-28g) foram inoculados no coxim plantar de sua pata direita com 50 µg das fosfolipases isoladas e veneno bruto de *B. Brazili*, solubilizados em 50 µL de tampão fosfato salino (PBS). Como controle, foi utilizado somente PBS que foi aplicado no coxim plantar esquerdo. O edema induzido pelas amostras foi avaliado pela medição das patas dos animais, utilizando um medidor de espessura (Mitutoyo 7301) nos tempos 0, 30, 60 e 120 minutos.

3.4.2 Avaliação da atividade miotóxica

Foram inoculados no músculo gastrocnêmio de camundongos *Swiss* (26-28 g), com 50 µg das fosfolipases isoladas, veneno bruto e MTX-II solubilizados em 50 µL de tampão fosfato salino (PBS). Grupos controles receberam somente 50 µL de PBS. Após 3 horas, o sangue dos animais foi coletado via intraorbital e centrifugado a 700xg por 5 minutos. Os níveis séricos de Creatina cinase (CK) foram utilizados para determinar a atividade miotóxica das amostras e foram quantificados conforme instruções do fabricante do Kit comercial (CK-NAC - Labtest).

3.4.3 Ensaio sobre a agregação plaquetária

Para este ensaio, utilizando as PLA₂s isoladas, foi aplicado o método descrito por Carlini e colaboradores (1985) e Fuly e colaboradores (1997; 2002), realizado em um Agregômetro Plaquetário (Chrono-log Corporation, modelo 490 2D) e as amostras monitoradas turbidimetricamente, com a utilização do *software* AggroLink. Aproximadamente 20mL de sangue foram coletados de um doador sadio por punção venosa e transferido para um recipiente contendo citrato 3,8% (1:9 citrato:sangue v/v), usado como anticoagulante. Em seguida o sangue foi centrifugado a 1.800 RPM por 12 min à temperatura ambiente com o objetivo de separar o Plasma Rico em Plaquetas (PRP). O conteúdo restante dessa primeira centrifugação foi novamente centrifugado por 2.500 RPM por 12 min, com o objetivo de coletar um plasma com menos plaquetas, ou seja, um Plasma Pobre em Plaquetas (PPP). Foi utilizado para cada testes 300 µL de PRP (acrescido de CaCl₂ 2 mM, concentração final) mantidos a 37°C por 2 minutos em cubetas de vidro siliconizadas sob agitação constante. Imediatamente, a agregação plaquetária foi iniciada pela adição dos agonistas fisiológicos: colágeno (16 µg/mL, concentração final) ou ADP (Adenosina Difosfato; 15 µM). Considerou-se como 100%

de agregação plaquetária a resposta induzida pelos agonistas em uma concentração máxima após 6 minutos de reação e 0 % de agregação plaquetária foi determinada pela transmitância causada pelo PRP sozinho. Para a avaliação do efeito das PLA₂s Braziliase-I e II (5 e 10µg) sobre a agregação plaquetária, estas, foram pré-incubadas com PRP por 2 minutos a 37°C, sob constante agitação e imediatamente após, o agonista foi adicionado e a agregação plaquetária monitorada por 6 minutos. O controle negativo utilizado foi uma solução salina.

3.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada utilizando o *software Graph Pad Prism* versão 6.0. Os resultados foram expressos pela média \pm desvio padrão (DP). E a significância das diferenças observadas foi determinada pelo teste ANOVA com valor $p \leq 0,05$ considerado como significativo e como *post-test* foi utilizado o Tukey.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 ISOLAMENTO E CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA DE PLA₂S ÁCIDAS DO VENENO DA SERPENTE *B. brazili*

4.1.1 Isolamento das PLA₂s

Os componentes purificados do veneno de serpente podem ser usados para o entendimento das funções desses constituintes no processo fisiopatológico resultante do envenenamento, bem como em aplicações biotecnológicas. A seleção do método adequado para purificação de determinada molécula deve ser dirigida com base em características físico-químicas ou biológicas e funcionais para obtenção de resultados satisfatórios. As informações pertinentes à estrutura das proteínas, tais como a similaridade com outras que foram purificadas, devem ser levadas em consideração e tendem a facilitar os processos de purificação (STÁBELI et al., 2012). Utilizou-se no presente trabalho três etapas cromatográficas para purificação de duas PLA₂ ácidas do veneno de *B. Brazili* que foram intituladas Braziliase-I e Braziliase-II: cromatografia de troca catiônica, interação hidrofóbica e fase reversa (**Figuras 4, 6 e 7**). O primeiro passo cromatográfico foi a realização de uma cromatografia de troca catiônica, utilizando Ambic pH 8 como tampão. Tal cromatografia resultou em 13 frações principais, sendo as frações 2 e 3 alvos selecionados para o estudo (**Figura 4**). Estas frações foram selecionadas por apresentarem pI ácido, atividade fosfolipásica e por conterem proteínas de massa molecular relativa de 14 kDa visualizada em gel de poliacrilamida 12,5% (**Figura 5**).

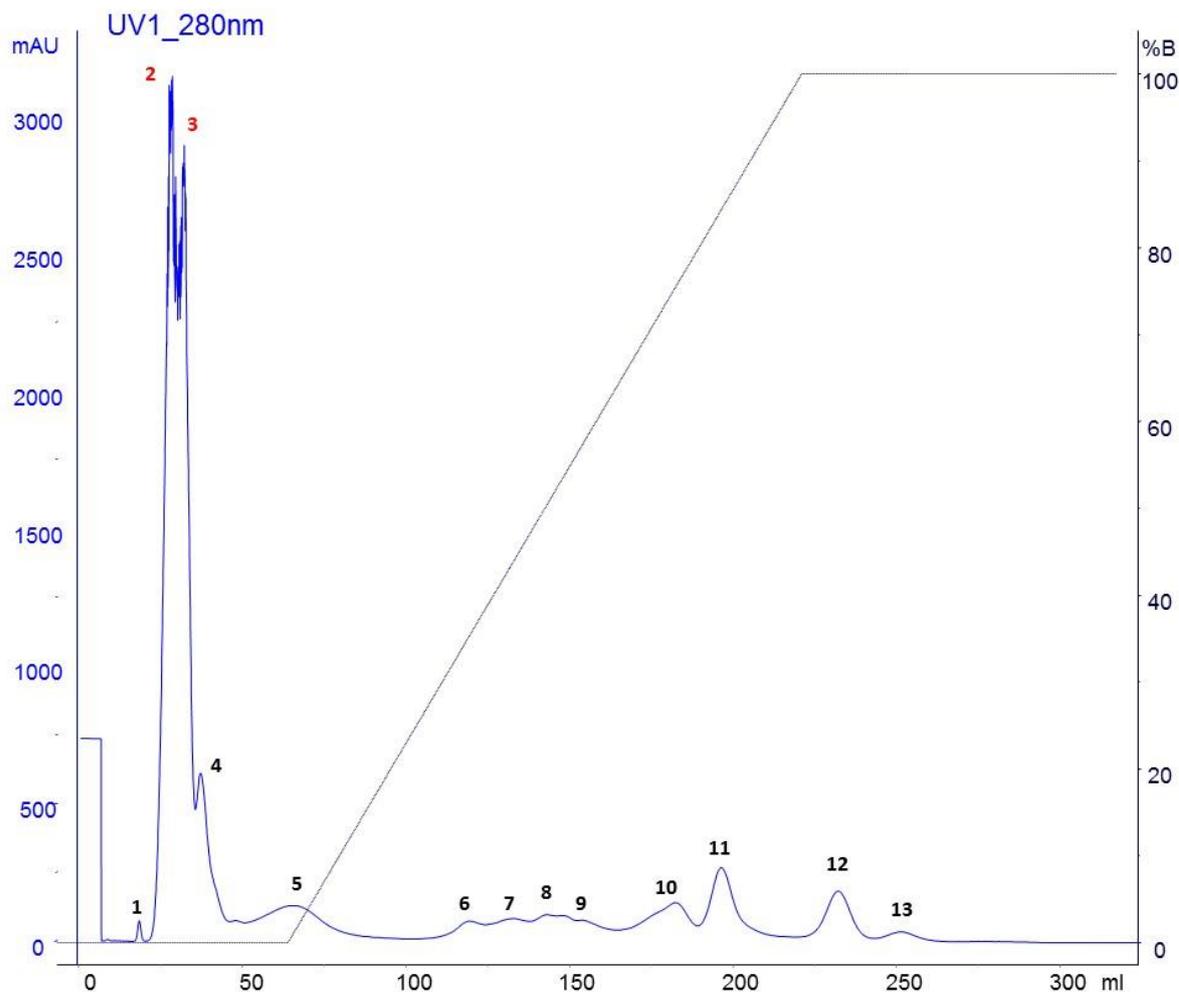


Figura 4 – Perfil cromatográfico do veneno de *Bothrops brazili* utilizando a cromatografia de troca catiônica. O veneno bruto de *B. brazili* foi aplicado em coluna CM-Sepharose (1x40 cm) previamente equilibrada com AMBIC 50 mM pH 8,0 e as frações eluídas sob gradiente de 0 a 100% de AMBIC 500 mM pH 8,0 em fluxo constante de 1mL/minuto

A cromatografia de troca iônica separa as moléculas com base nas diferenças de carga residual superficial líquida. As moléculas variam consideravelmente em suas propriedades de carga e apresentam diferentes graus de interação com a resina cromatográfica de acordo com diferenças em sua carga total, densidade de carga e distribuição de carga de superfície. Os grupos carregados de uma molécula, que contribuem para a carga de superfície líquida possuem diferentes valores de pKa, dependendo da sua estrutura química e microambiente. Uma vez que todas as moléculas com grupos ionizáveis pode ser titulada, a sua carga líquida da superfície é altamente dependente do pH. No caso das proteínas, as quais são constituídas de muitos aminoácidos diferentes que contêm grupos ácidos e básicos fracos, a sua carga líquida de superfície muda gradualmente à medida que há mudanças de pH do meio. Sendo

assim, proteínas com carga residual superficial positiva em determinado pH (abaixo de seu ponto isoelétrico), podem ser separadas com o uso de uma resina trocadora de cátions (CM-Sepharose, polímeros formados agarose com grupos carboximetil ligados) e por outro lado, proteínas com carga residual superficial negativa, ou seja, que encontram-se em ambiente com pH acima de seu ponto isoelétrico, podem ser separadas com uso de resina trocadora de ânions (por exemplo uma DEAE-Sepharose, polímeros formados agarose com grupos dietilaminoetil ligados) (JACOB, 1999).

Em diversos trabalhos observa-se que o uso de resinas trocadoras de cátions são métodos bastante eficientes na obtenção de PLA₂s de venenos botrópicos. A versatilidade desta técnica pode ser observada no trabalho realizado por Andrião-Escarso e colaboradores (2000), que comparou o fracionamento de diversos venenos botrópicos. Neste trabalho, os venenos foram fracionados em coluna contendo CM-Sepharose (2 x 20 cm), equilibrada com bicarbonato de amônia 50mM pH 8,0 e eluídas com gradiente salino de 50 a 500mM do mesmo reagente. A técnica mostra-se eficiente para separar o conteúdo ácido (eluído antes do gradiente), neutro (intergradiente) e básico (após o gradiente), sendo ainda mais interessante para purificar PLA₂s básicas.

Com base no exposto, observa-se que o conteúdo proteico ácido do veneno de *B. brazili* foi eluído antes do gradiente de AMBIC (50 mM e pH 8,0). Nestas condições, as proteínas cujos *pI* são ácidos encontram-se desprotonadas, não interagindo com os grupos carboximetil da resina.

O perfil proteico das frações foi analisado por eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (**Figura 5**), onde pode-se verificar a composição proteica do veneno da *B. brazili* e frações cromatográficas (advindas da cromatografia de troca catiônica), sendo também visualizadas a presença de proteínas com massa molecular compatível com PLA₂s nas frações ácidas (2 e 3) que foram submetidas as próximas etapas de separação (**Figura 6 e 7**).

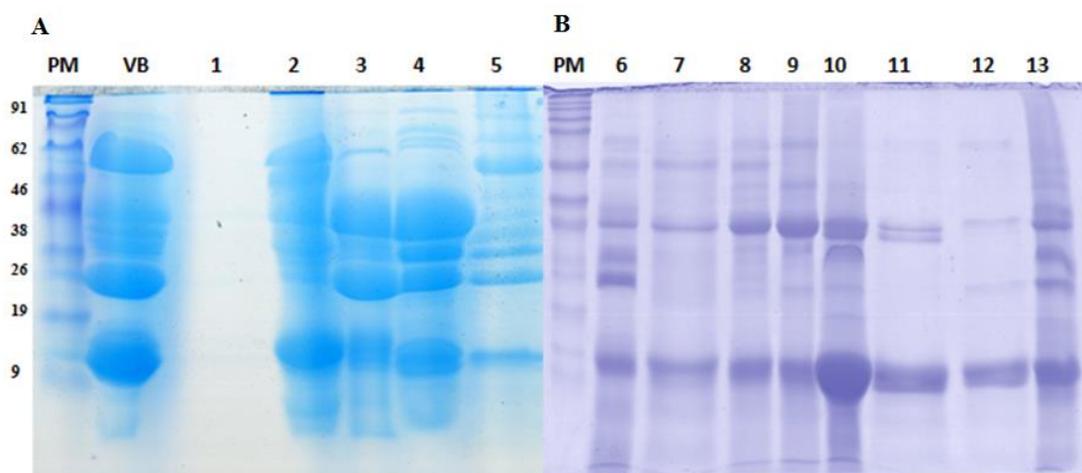


Figura 5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% das frações liofilizadas advindas da cromatografia de troca catiônica utilizando o veneno de *B. brazili*. Foram eluídas 13 frações principais apresentando todo o perfil proteico do veneno. **(A)**: PM = padrão de massa molecular, VB = veneno bruto, linha 01: fração 1, linha 02: fração 2, linha 03: fração 3, linha 04: fração 4 e linha 05: fração 5. Nas frações 2 e 3 são visualizadas proteínas com massa molecular de aproximadamente 14 kDa, ambas foram selecionadas para etapas posteriores de purificação **(B)**: PM = padrão de massa molecular, linha 06: fração 6, linha 07: fração 7, linha 08: fração 8, linha 09: fração 9, linha 10: fração 10, linha 11: fração 11, linha 12: fração 12, linha 13: fração 13.

Como segunda etapa de purificação, foi realizada a cromatografia de interação hidrofóbica (ou CIH) em coluna n-butyl Sepharose® (**Figura 6**). Para tanto, as frações 2 e 3 (identificadas na **figura 4**) foram reunidas, liofilizadas e solubilizadas em solução contendo alta concentração de sais (4M de NaCl), com o objetivo de expor os resíduos de aminoácidos hidrofóbicos das proteínas.

A cromatografia de interação hidrofóbica foi descrita primeiramente por Shatiel e Er-el em 1973 e se baseia na interação de ligantes parcialmente hidrofóbicos fixados em um suporte cromatográfico e áreas hidrofóbicas localizadas na superfície das proteínas. Neste contexto, o uso de altas concentrações de sais induz a externalização de núcleos hidrofóbicos das proteínas, favorecendo a interação com a fase estacionária. Por meio de um decréscimo na concentração de sais durante o gradiente, os núcleos hidrofóbicos das proteínas tendem a se internalizar, reduzindo a hidrofobicidade das proteínas, culminando em sua dessorção (JACOB, 1999).

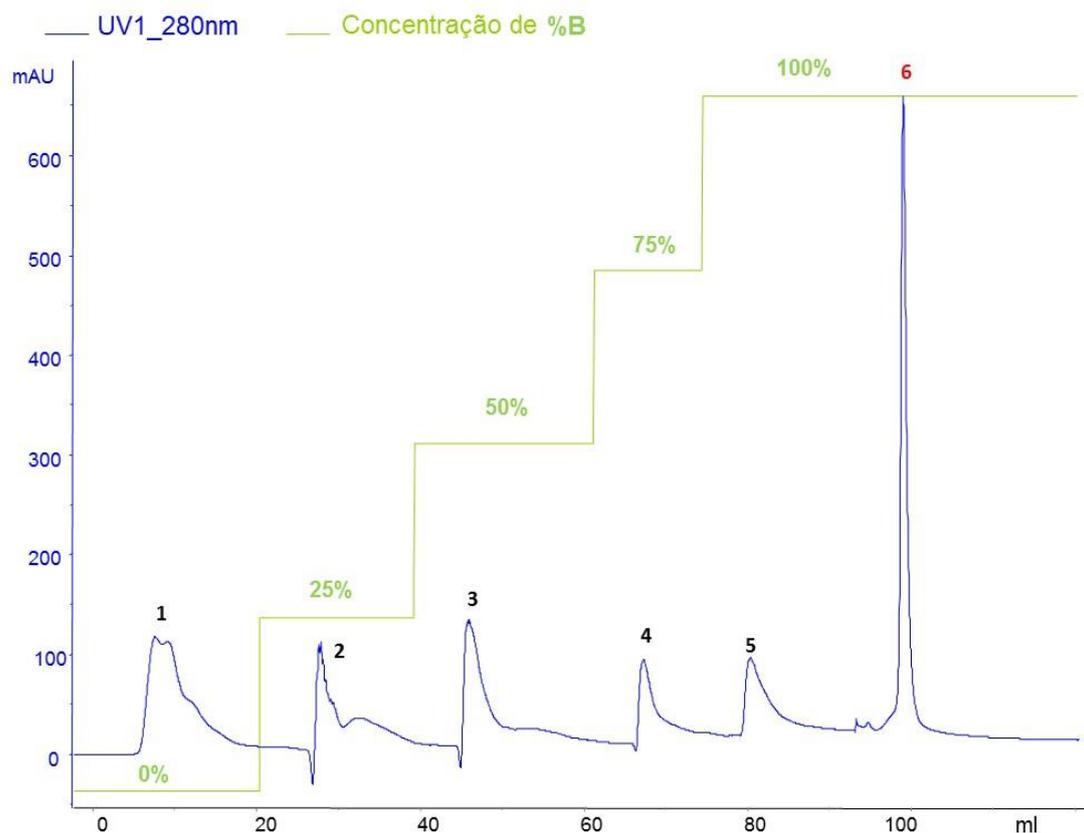


Figura 6. Perfil cromatográfico das frações 2 e 3 do veneno de *Bothrops brazili*, advindas da cromatografia de troca catiônica. As frações selecionadas foram submetidas ao segundo passo de purificação utilizando-se a cromatografia de interação hidrofóbica em coluna n-Butyl-HP (5 x 15 cm). A coluna foi previamente equilibrada com NaCl 4M+AMBIC 20 mM pH 8 (tampão A), como tampão B utilizou-se AMBIC 20 mM pH 8 e para eluição da fração 6 (em vermelho) utilizou-se apenas água miliq em um fluxo contínuo de 2,5 mL/minuto. Para eluição das frações utilizou-se o seguinte gradiente descontínuo: 0, 25, 50, 75 e 100% do tampão B e por último 100% de água miliq. A fração 6 contendo as fosfolipases foram selecionadas para o terceiro passo cromatográfico.

Dessa maneira, observou-se a eluição de 6 frações diferentes advindas do material selecionado após a cromatografia de troca catiônica, sendo que a fração de interesse (fração 6) demonstrou uma alta interação com o grupo ligante da resina, necessitando de um ambiente aquoso com concentração salina nula (resistividade 18.2 Ω m). Verificou-se nesta etapa que ainda não foi possível a separação das isoformas de fosfolipases A₂ ácidas, necessitando de um terceiro método de cromatografia.

O terceiro passo cromatográfico foi a realização de uma cromatografia de fase reversa (CFR) em coluna de C18 (25 x 0,45 cm – Discovery) (**Figura 7**).

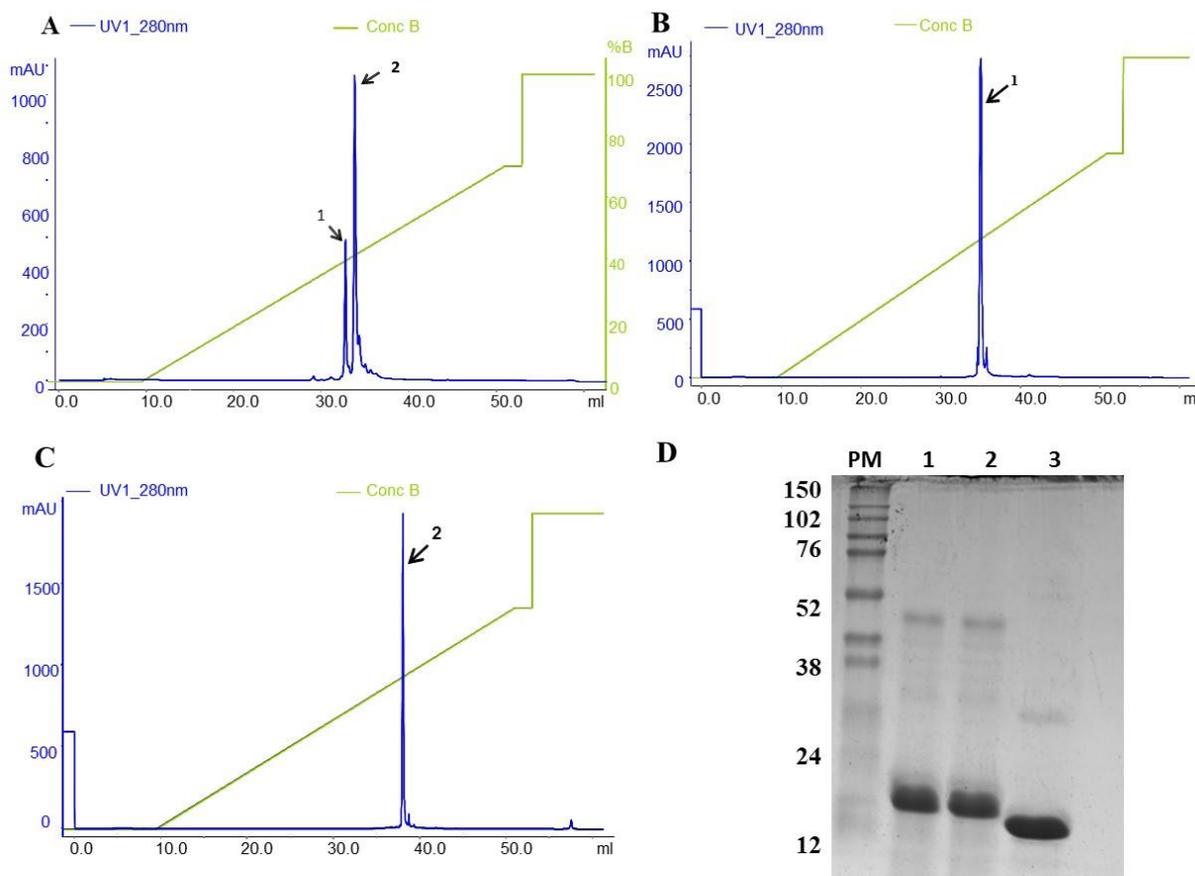


Figura 7 – Cromatografia de Fase Reversa evidenciando as duas fosfolipases A_2 ácidas (respectivamente Braziliase-I e II) do veneno de *B. brazili* com elevado grau de pureza e SDS-PAGE demonstrando a homogeneidade das enzimas isoladas. **(A)**: A fração 6 advinda da CIH foi submetida ao 3º passo cromatográfico em coluna Discovery C18 (25x4,6 cm) previamente equilibrada com TFA 0,1% (Solvente A) e eluída com Acetonitrila 99%+TFA 0,1% (Solvente B) em gradiente de 0-100%, sob fluxo constante de 1mL/minuto. A eluição das proteínas foi monitorada por absorbância a 280nm. **(B)**: Braziliase-I purificada, sendo retirada na coluna por até a concentração de 42% da solução B. **(C)**: Braziliase-II purificada, sendo retirada na coluna por até a concentração de 44% da solução B. **(D)**: Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% apresentando as fosfolipases A_2 ácidas isoladas do veneno de *B. brazili* respectivamente Braziliase-I (linha 1) e II (linha 2). A MTX-II (linha 3), uma PLA_2 miotóxica básica de *B. brazili*, foi utilizada como padrão de massa molecular (14 kDa). PM = padrão de massa molecular.

A cromatografia de fase reversa separa as moléculas de acordo com diferenças de hidrofobicidade. Em teoria, cromatografia de interação hidrofóbica e fase reversa são técnicas estreitamente relacionadas uma vez que ambas são baseadas em interações entre partes hidrofóbicas na superfície das biomoléculas e as superfícies hidrofóbicas de um meio de cromatografia. No entanto, na prática, as técnicas são muito diferentes. A superfície de um meio de CFR é geralmente mais hidrofóbica do que a de um meio de CIH. Isto conduz a interações fortes que para serem desfeitas devem-se utilizar soluções

menos polares quando comparadas à água, tais como acetonitrila ou metanol. Por meio da CFR pode-se alcançar separações de alta resolução, resolvendo os componentes que têm apenas pequenas diferenças na hidrofobicidade. As separações podem ser realizadas utilizando uma eluição isocrática, no entanto, mais frequentemente, é usado um gradiente de eluição. A CFR pode também ser usada para separar moléculas de hidrofobicidade significativamente diferentes usando um passo de eluição (WILLIAMS e FRASCA, 2001).

Por meio da cromatografia de fase reversa houve a purificação de duas isoformas de fosfolipases A₂ ácidas do veneno de *B. brazili*, nomeadas de Braziliase-I e Braziliase-II. Observou-se que os três passos cromatográficos foram eficientes para purificação das fosfolipases ácidas, sendo o grau de pureza confirmado pela própria CFR (**Figura 7**), SDS-PAGE (**Figura 5**), eletroforese bi-dimensional (**Figura 8**) e espectrometria de massa (**Figuras 10 e 11**).

Até o presente momento não há publicações relatando a purificação de isoformas ácidas de PLA₂s do veneno de *B. brazili*. As PLA₂s do veneno de serpente são um dos componentes mais estudados, sendo sua purificação realizada utilizando-se uma combinação de métodos cromatográficos como exclusão molecular, troca iônica, fase reversa e afinidade usando inibidores naturais, anticorpos e heparina (OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2004). No trabalho publicado por Nunes e colaboradores (2011), é descrito o isolamento de uma fosfolipase ácida denominada BL-PLA₂, obtida do veneno de *Bothrops leucurus* por meio de duas etapas cromatográficas. Numa primeira etapa, foi utilizada a cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose) equilibrada com bicarbonato de amônio, pH 7,8. A fração ácida, advinda desta cromatografia foi liofilizada e submetida a uma segunda etapa de purificação utilizando CIH em coluna contendo Fenil-Sepharose CL-4B (1 x 10 cm), previamente equilibrada com solução de Tris-HCl 10 mM, NaCl 4 M, pH 8,5. A eluição ocorreu sob gradiente decrescente de NaCl em ambiente tamponado (Tris-HCl 10 mM, pH 8,5), encerrando o processo em um ambiente isento de eletrólitos. Ao final das duas etapas cromatográficas, houve a purificação da BL-PLA₂ de pI 5,4, enzimaticamente ativa. A metodologia para purificação das Braziliases foi similar a purificação da BL-PLA₂, indicando a eficácia do método. O mesmo método também foi eficiente para o isolamento da Bp-PLA₂, uma PLA₂ ácida de 15,8 kDa e pI 4,3, isolada do veneno de *B. pauloensis* (RODRIGUES et al., 2007).

Para o isolamento de BmooTX-I, uma PLA₂ ácida do veneno de *B. moojeni*, Santos-Filho e colaboradores (2008) empregaram 3 passos cromatográficos: troca iônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica. A troca iônica foi realizada em coluna DEAE-Sepharose (1.5 x 15 cm) e para a eluição das frações utilizou-se um gradiente linear do tampão AMBIC 50-300 mM pH 8. O segundo passo cromatográfico realizado em coluna Sephadex G-75 (1.0 x 100 cm) utilizou 50 mM de AMBIC pH 8,0. Para o terceiro passo de purificação utilizou-se uma coluna Fenil-Sepharose CL-4B (10 x 0,6 cm) e os tampões Tris-HCl 10 mM e NaCl 4 M pH 8,5. A cromatografia de fase reversa foi realizada para a análise do grau de pureza e utilizou uma coluna C18 (4.6 x 100 cm) previamente equilibrada com ACN 5% e TFA 0,1% e a eluição ocorreu por meio de um gradiente de 0-100% da solução de ACN 60% e TFA 0,1%.

Andrião-Escarso e colaboradores (2002) também fez uso da troca iônica como primeiro método de purificação da BthA-I PLA₂, uma PLA₂ Asp49 do veneno de *B. jararacussu*. Foi utilizado uma coluna CM-Sepharose (2,0 x 200 cm) e um gradiente de AMBIC 50-500 mM pH 8,0. O último passo de purificação foi a cromatografia de fase reversa em coluna C18 (2,0 x 25,0 cm) em um gradiente de 30-100% de ACN 60% e TFA 0,1%.

Teixeira e colaboradores (2011) utilizaram a troca catiônica em coluna CM-Sepharose (2,0 x 20 cm) e tampão AMBIC pH 8,0 para isolar a PLA₂ ácida BpirPLA₂-I. No entanto, para eluição das amostras foi utilizado um gradiente de NaCl 1M em tampão AMBIC. A fração selecionada foi submetida a uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 (4,6 x 150 mm) em um gradiente de 30-100% de ACN 60% e TFA 0,1%.

De forma resumida, pode-se elencar os métodos utilizados da seguinte maneira: troca catiônica seguida de interação hidrofóbica (NUNES et al., 2011; RODRIGUES et al., 2007); troca aniônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica (SANTOS-FILHO et al., 2008); troca catiônica seguida de fase reversa (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; TEIXEIRA et al., 2011). Comparando os métodos utilizados nos referidos trabalhos com o utilizado neste, pode-se discutir que a utilização da **troca catiônica seguida da interação hidrofóbica**, possivelmente, não seria eficaz para a separação das isoformas Braziliase-I e II, visto que as mesmas são constituídas de uma proporção muito similar de aminoácidos hidrofóbicos, sendo eluídas juntas nesta última cromatografia (**Figura 06**). No segundo grupo (**troca aniônica, exclusão molecular e interação hidrofóbica**), a troca aniônica, certamente separaria o conteúdo ácido do

neutro e do básico, possivelmente até de forma mais eficiente que a troca catiônica, neste contexto, ela portanto se tornaria uma opção relevante como primeira etapa de purificação. A segunda etapa, exclusão molecular, resultaria na eluição de PLA₂s ácidas e básicas juntas, pois esta cromatografia é baseada na diferença de massa molecular e a interação hidrofóbica como última etapa seria ineficaz. O terceiro método, **troca catiônica seguida de fase reversa**, poderia ser eficaz para separar as Braziliase-I e II, já que a partir do conteúdo ácido advindo da troca catiônica poderia ser separado na fase reversa pois mesmo moléculas muito similares em seu conteúdo hidrofóbico poderiam ser purificadas quando submetidas a um gradiente com solução apolar.

O método de purificação de PLA₂s ácidas utilizado no presente trabalho (troca iônica, interação hidrofóbica e fase reversa) foi eficaz na separação deste tipo de molécula.

4.1.2 Eletroforese bidimensional

O ponto isoelétrico (pI) das PLA₂s isoladas foi determinado por eletroforese bidimensional, sendo observado um pI igual a 5,2 para a Braziliase-I e 5,3 para a Braziliase-II (**Figura 8**).

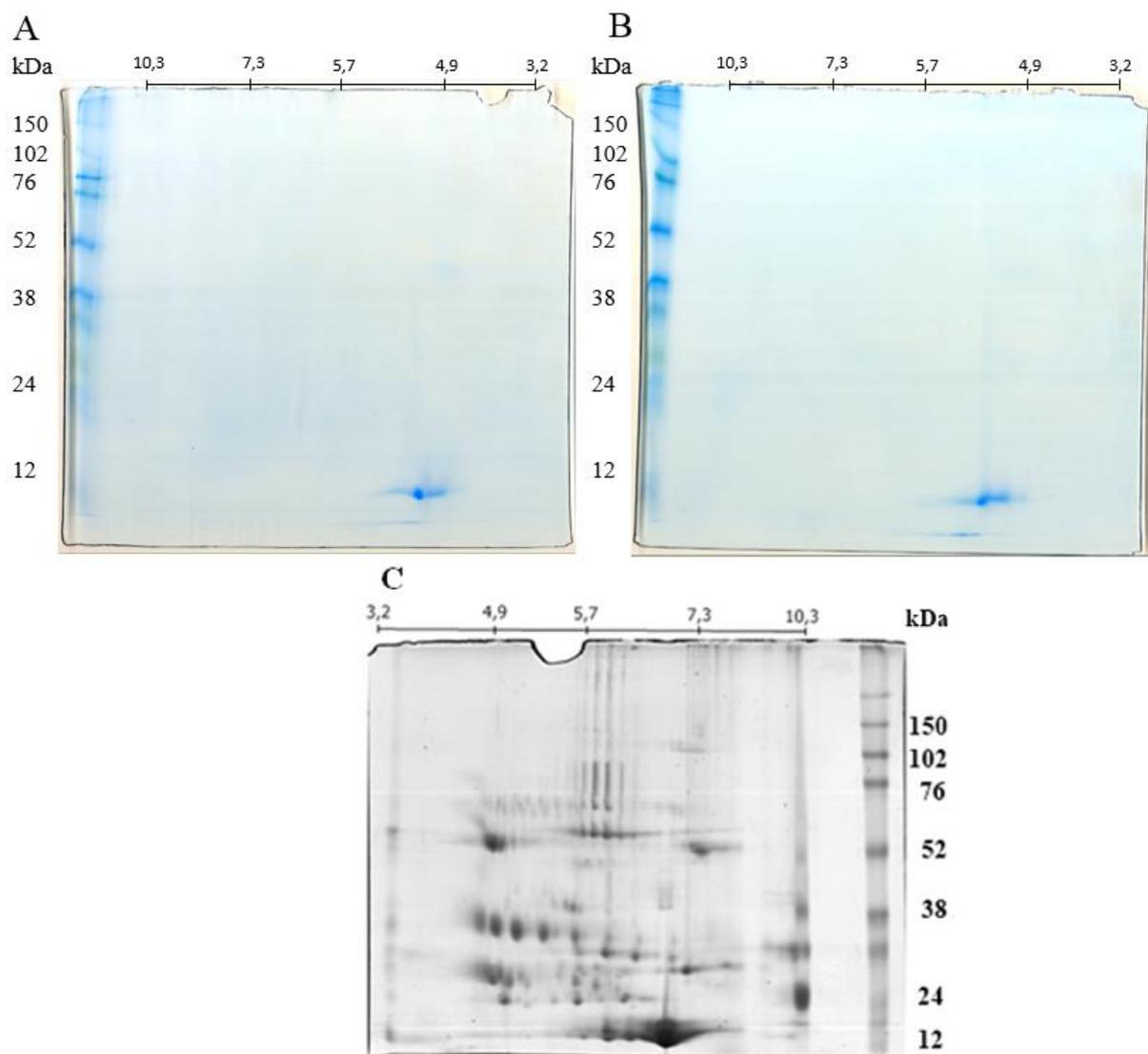


Figura 8 – Eletroforese bidimensional (2D) das PLA₂s ácidas isoladas e do veneno bruto de *B. brazili*. **(A)**: Eletroforese 2D de Braziliase-I, demonstrando um pI de 5,2. **(B)**: Eletroforese 2D de Braziliase-II, demonstrando um pI de 5,3. **(C)**: Eletroforese 2D do veneno bruto *B. brazili*. Fonte do gel contendo veneno bruto: Anderson M. Kayano (KAYANO, 2013).

As PLA₂s de pI ácido foram descritas em veneno de algumas serpentes botrópicas (**Figura 9**). Neste contexto, os valores de pI encontrados para as PLA₂s purificadas no presente trabalho são similares aos encontrados para outras PLA₂s ácidas descritas na literatura científica (**Tabela 3**).



Figura 9 – PLA₂s ácidas isoladas de venenos botrópicos. Observa-se que aproximadamente 20 isoformas de PLA₂s ácidas foram isoladas e caracterizadas de 15 espécies de serpentes do gênero *Bothrops*, incluindo as enzimas descritas neste trabalho.

Tabela 3 – PLA₂s ácidas isoladas com pI similar ao encontrado para as Braziliases-I e II.

Gênero <i>Bothrops</i>	Fosfolipases A ₂ ácidas	pI	Mr (Da)	Referência/Sequencia Identificadora (GI)*
<i>B. ammodytoides</i>	PLA ₂	6,13	13.853,65	Clement (et al., 2012)
<i>B. brazili</i>	Braziliase-I	5,2	13.894,38	Presente trabalho
<i>B. brazili</i>	Braziliase-II	5,3	13.869,63	Presente trabalho
<i>B. insularis</i>	PLA ₂	5	13.984.20	Braga (et al., 2008)
<i>B. insularis</i>	BinTX-I	5,05	13.975	Cogo (et al., 2006)
<i>B. insularis</i>	BinTx-II	4,49	13.788	Cogo (et al., 2006)
<i>B. asper</i>	BaspPLA2-II	4,9	14.212	Fernández (et al., 2010)
<i>B. lanceolatus</i>	PLA ₂	4,9	14.500	De Araújo (et al., 2010)
<i>B. alternatus</i>	Ba SpII RP4	4,8	14.185,48	Denegri (et al., 2010)
<i>B. neuwiedi</i>	P1	4,8	15.000	Daniele, Bianco e Fidelio, 1995
<i>B. neuwiedi</i>	P2	4,6	16.000	Daniele, Bianco e Fidelio, 1995
<i>B. pictus</i>	PLA ₂	4,6	13.732	GI:23396779

<i>B. jararaca</i>	BjPLA ₂	4,5	14.303	Serrano (et al.,1999)
<i>B. jararacussu</i>	BthA-I-PLA ₂	4,5	13.700	Andrião-Escarso (et al., 2002)
<i>B. pauloensis</i>	Bp-PLA ₂	4,3	15.8	Rodrigues (et al., 2007)
<i>B. moojeni</i>	BmooTX-I	4,2	15.000	Santos-Filho (et al., 2008)
<i>B. moojeni</i>	Bmoo-I-PLA ₂	5,2	13.601	Silveira (et al., 2013)
<i>B. pirajai</i>	BpirPLA ₂ -I	4,9	14.500	Teixeira (2009)

* <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/GI:23396779>

Muitas PLA₂s Lys49 básicas tem sido purificadas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e caracterizadas estrutural e funcionalmente. No entanto, pouco se conhece sobre as PLA₂s Asp49 ácidas, devido à baixa concentração nos venenos. Até o momento, elas tem sido caracterizadas como enzimas que possuem uma alta atividade catalítica, geralmente não possuem muitas atividades tóxicas, baixa potência letal em camundongos e exibem ampla variedade de efeitos farmacológicos (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; ROBERTO et al., 2004). No entanto, em concentrações/doses geralmente maiores, se comparado com as PLA₂s básicas, verifica-se que as ácidas desencadeiam atividades tóxicas como congestão pulmonar, hemorragia intraperitoneal, inibição da retração do coágulo, alterações no tecido muscular com o aumento dos níveis de creatina quinase (CLEMENT et al., 2012) e podem induzir lesão em tecidos do fígado, pulmão e coração (NISENBOM; SEKI e VIDAL, 1986). Outras atividades são descritas como edema, miotoxicidade, atividade hipotensiva, bloqueio neuromuscular e inibição da agregação plaquetária (KETELHUT et al., 2003; SANTOS-FILHO et al., 2008). Além dessas atividades, outras de cunho biotecnológico tem sido investigadas, como com a BpirPLA₂-I, isolada de *B. pirajai* que demonstrou efeito citotóxico sobre células tumorais, bactérias, fungos e leishmanias (TEIXEIRA, 2009). Estes exemplos citados, bem como outros da literatura científica podem nortear os possíveis efeitos destas enzimas durante o envenenamento ofídico e evidenciar que o seu potencial biotecnológico precisa ser investigado.

4.1.3 Espectrometria de massa

Os espectros de massas foram obtidos em Espectrômetro de Massa AXIMA/TOF² (Shimadzu Biotech) utilizado para elucidar as massas moleculares das

toxinas isoladas, bem como confirmar a pureza das mesmas. As **figuras 10 e 11**, respectivamente, apresentam o perfil de massas moleculares da Braziliase-I de 13.894,38 Da e da Braziliase-II de 13.869,63 Da.

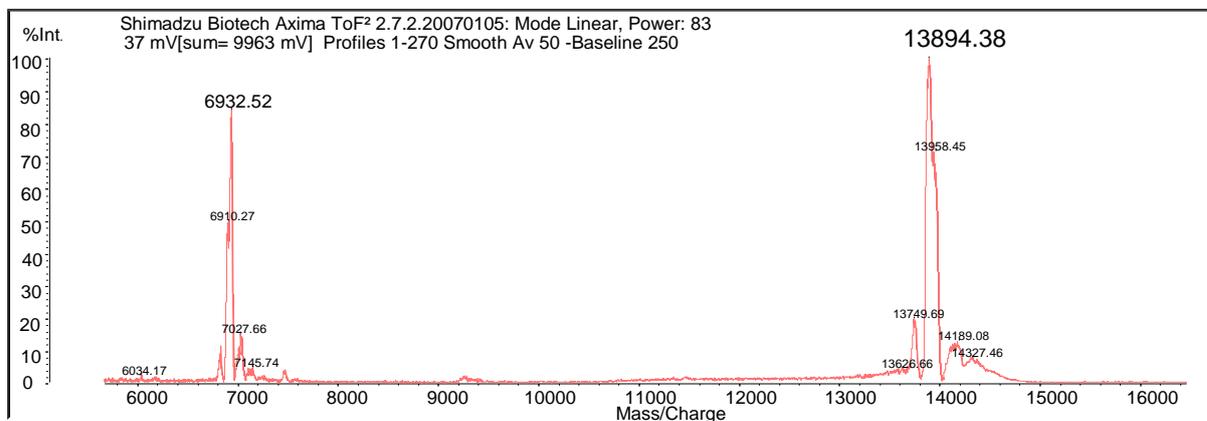


Figura 10 – Espectro de massa em AXIMA TOF² de Braziliase-I. O espectro demonstra a massa da enzima Braziliase-I, 13.894 Da. Como matriz ionizante utilizou-se uma solução saturada de ácido sinápico e esta foi homogeneizada com a amostra em uma proporção de 3:1 (matriz/proteína) e após a co-cristalização na placa do aparelho, esta foi introduzida na câmara a vácuo e analisada em modo linear. O espectro representa a média dos pulsos a laser.

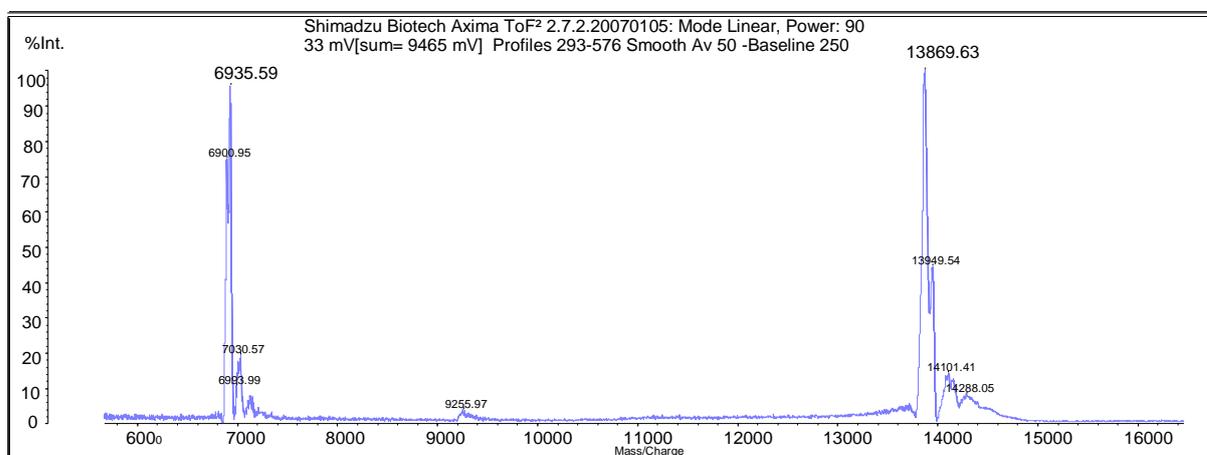


Figura 11 – Espectro de massa, em AXIMA TOF² de Braziliase-II. O espectro demonstra a massa da enzima Braziliase-II, 13.869 Da. Como matriz ionizante, foi utilizada uma solução saturada de ácido sinápico e esta foi homogeneizada com a amostra em uma proporção de 3:1 (matriz/proteína) e após a co-cristalização na placa do aparelho, esta foi introduzida na câmara a vácuo e analisada em modo linear. O espectro representa a média dos pulsos a laser.

Os valores de massa molecular observados na espectrometria de massa confirmam os valores relativos visualizados no gel de eletroforese monodimensional (**Figura 7D**). A massa molecular de aproximadamente 14kDa das PLA₂ isoladas são similares as do veneno de outros membros da família Viperidae, sendo para esta família,

descritas PLA₂ com massa molecular entre 13 e 17kDa (SIX e DENNIS, 2011). Valores aproximados foram encontrados para os seguintes monômeros de PLA₂s ácidas de veneno botrópicos: BthA-I-PLA₂ (*B. jararacussu*) 13.700 Da (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002), BmooPLA₂ 13.601 Da (SILVEIRA et al., 2013) e BmooTX-I 15.000 Da (SANTOS-FILHO et al., 2008) (*B. moojeni*) e BpirPLA-I 14.500 Da (TEIXEIRA et al., 2011) (*B. pirajai*) e Bp-PLA₂ 15.800 Da (RODRIGUES et al., 2007) (*B. pauloensis*).

4.1.4 Determinação da estrutura primária e estudos de similaridade

A elucidação das estruturas primárias das Braziliases-I e II foram o resultado da análise combinada do sequenciamento N-terminal (degradação química de Edman) e espectrometria de massa (sequenciamento *de novo*), evidenciando um número de resíduos de aminoácidos compatível com as PLA₂s secretadas do grupo II (**Figura 12**). Além disso, alguns aminoácidos foram inseridos após o estudo de similaridade.

O alinhamento entre as PLA₂s isoladas apresentou uma identidade de 93%. Com relação a estrutura primária, as PLA₂s variaram em 6 resíduos de aminoácidos.

```

Braziliase-I  NLWQFEMLMKIALTSGFMFYSSYGCYCGWGGHGRPKDASDRCCFVHDCCYGKVTTCNPKFD
Braziliase-II NLWQFEMLMKIAKTSGFMFYSSYGCYCGWGGHGRPQDAADRCCFVHDCCYGKVT--NPK-D
*****
Braziliase-I  -YTYSEENGVVVCGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDITYDNKYWFFGAKNCQEESDPC
Braziliase-II -YTYSEENGVVVCGDDPCKKQICECDRVAATCFRDNKDITYDNKYWFFPAKNCQEESDPC
*****

```

Figura 12. Alinhamento da Braziliase-I e Braziliase-II. O alinhamento apresentou 93% de identidade entre as PLA₂s. Em amarelo é destacado os resíduos de aminoácidos que são diferentes nas duas isoformas.

A presença dos resíduos de aminoácidos que compõe o sítio ativo da enzima pode ser evidenciado (His48, Asp99, Tyr52 e Tyr73), bem como os resíduos relacionados com a estabilização do Ca²⁺ (Tyr28, Gly30, Gly 32 e Asp49) e 14 resíduos de cisteína responsáveis pela formação de sete pontes dissulfeto intramoleculares (Cys27- Cys126, Cys29-Cys45, Cys44-Cys105, Cys50-Cys133, Cys51-Cys98, Cys66-Cys91 e Cys84-Cys96) que estabilizam a estrutura terciária desta classe de enzima.

O estudo comparativo da estrutura primária das toxinas demonstrou elevada identidade com outras PLA₂s de veneno de serpentes, sobretudo quando comparadas com as PLA₂s ácidas de venenos botrópicos. A **figura 13** apresenta o alinhamento

múltiplo com outras PLA₂s e na **tabela 4** consta o grau de identidade com outras PLA₂s do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

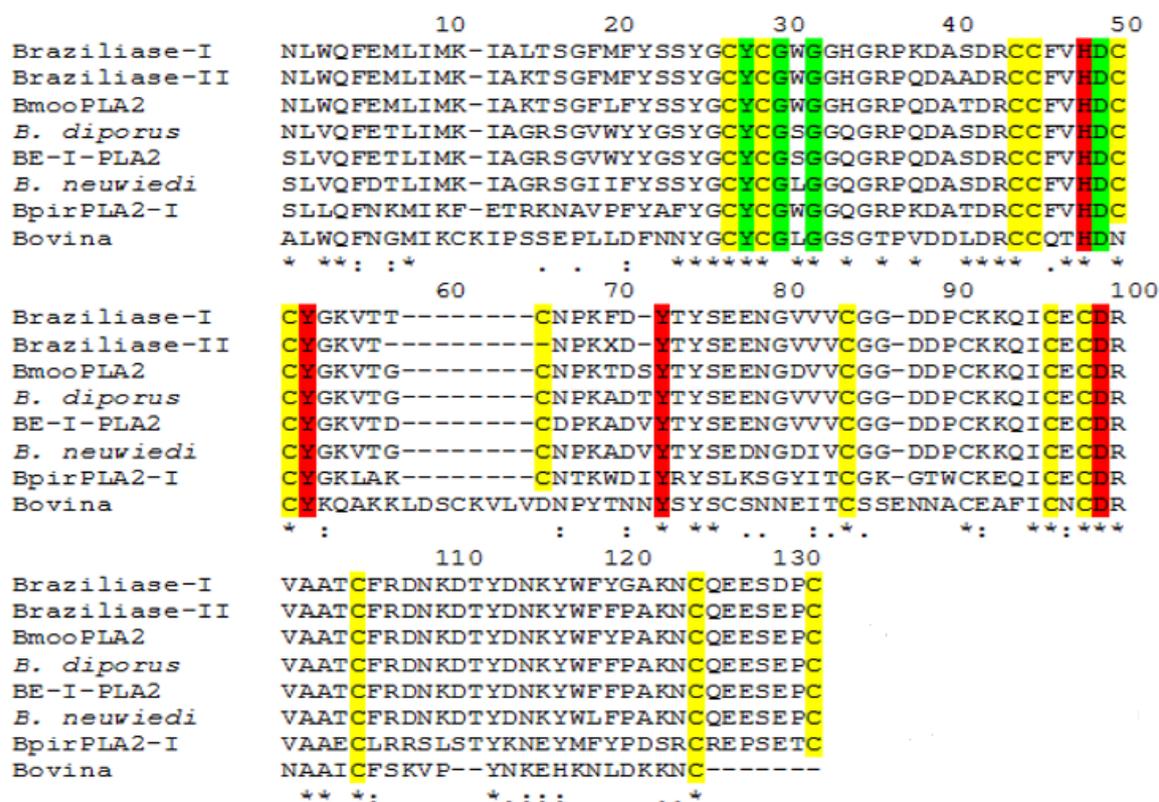


Figura 13 – Alinhamento das sequências de braziliase-I e braziliase-II com PLA₂s de venenos de serpentes e bovina. Os resíduos de aminoácidos destacados em vermelho (His-48, Asp-99, Tyr-52 e Tyr-73) formam o sítio ativo da enzima. Os resíduos destacados em verde (Asp-49, Tyr-28, Gly-30 e Gly-32) são aqueles que se ligam ao íon de Cálcio, co-fator responsável pela estabilização da conformação catalítica da enzima. Os resíduos destacados em amarelo são as Cisteínas, responsáveis pela formação das pontes dissulfeto.

Tabela 4 – Identidade da Braziliase-I e II com outras Pla₂s ácidas do veneno de serpentes do gênero *Bothrops*.

Serpentes	Denominação	Identidade com Braziliase-I	Identidade com Braziliase-II
<i>Bothrops moojeni</i>	BmooPLA ₂	92%	93%
<i>Bothrops diporus</i>	PLA ₂	86%	87%
<i>Bothrops erythromelas</i>	BE-I-PLA ₂	84%	85%
<i>Bothrops pirajai</i>	Bpir-PLA ₂ -I	83%	80%
<i>Bothrops newiedi</i>	PLA ₂	83%	85%

A figura 17 mostra o modelo teórico inicial da Braziliase-I e II construído a partir do molde da estrutura terciária de CB PLA₂ de *C. d. terrificus* utilizando o servidor HHpred e a visualização pelo *software* PyMOL.

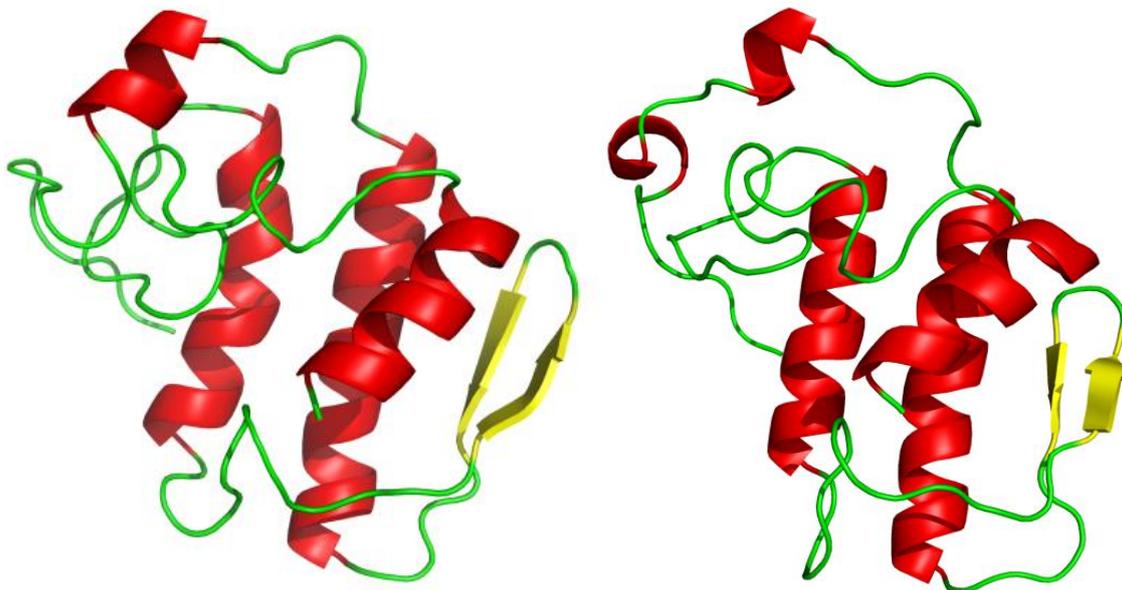


Figura 17 – Modelo teórico inicial das estruturas tridimensionais da Braziliase-I e II, respectivamente, de *B. brazili*. O modelo foi construído a partir do servidor HHpred utilizando como molde a estrutura da PLA₂CB de *C. d. terrificus*.

A modelagem molecular por homologia estrutural consiste de quatro passos: **encontrar estruturas conhecidas relacionadas com a sequência a ser modelada, alinhamento da sequência com o molde, construção do modelo e validação do modelo**. Dessa forma, o servidor HHpred (utilizado no presente trabalho) pode produzir, a partir de alinhamentos entre duas proteínas ou alinhamentos múltiplos, modelos estruturais 3D que são calculados pelo software MODELLER (BAKER e SALI, 2001; SÖDING, BIEGERT e LUPAS, 2005).

Após a construção do modelo inicial gerado por modelagem por homologia estrutural, a estabilidade das estruturas de Braziliase-I e II foram avaliadas por meio de simulações de dinâmica molecular (DM), no tempo de 10ns e 20ns para Braziliase-I e II, respectivamente, realizada pelo software GROMACS (4.5.4). Calculou-se a raiz quadrada da média do desvio (RMSD – do inglês “*Root Mean Square Deviation*”) de átomos do esqueleto ao longo do tempo de simulação de DM para investigar a estabilidade da estrutura. A **Figura 18** apresenta os valores de RMSD durante a simulação de DM, indicando que, após cerca de 8 e 7 ns, respectivamente para

Braziliase-I e II, as estruturas foram estabilizadas, uma vez que as posições dos átomos da cadeia principal foram estabilizadas.

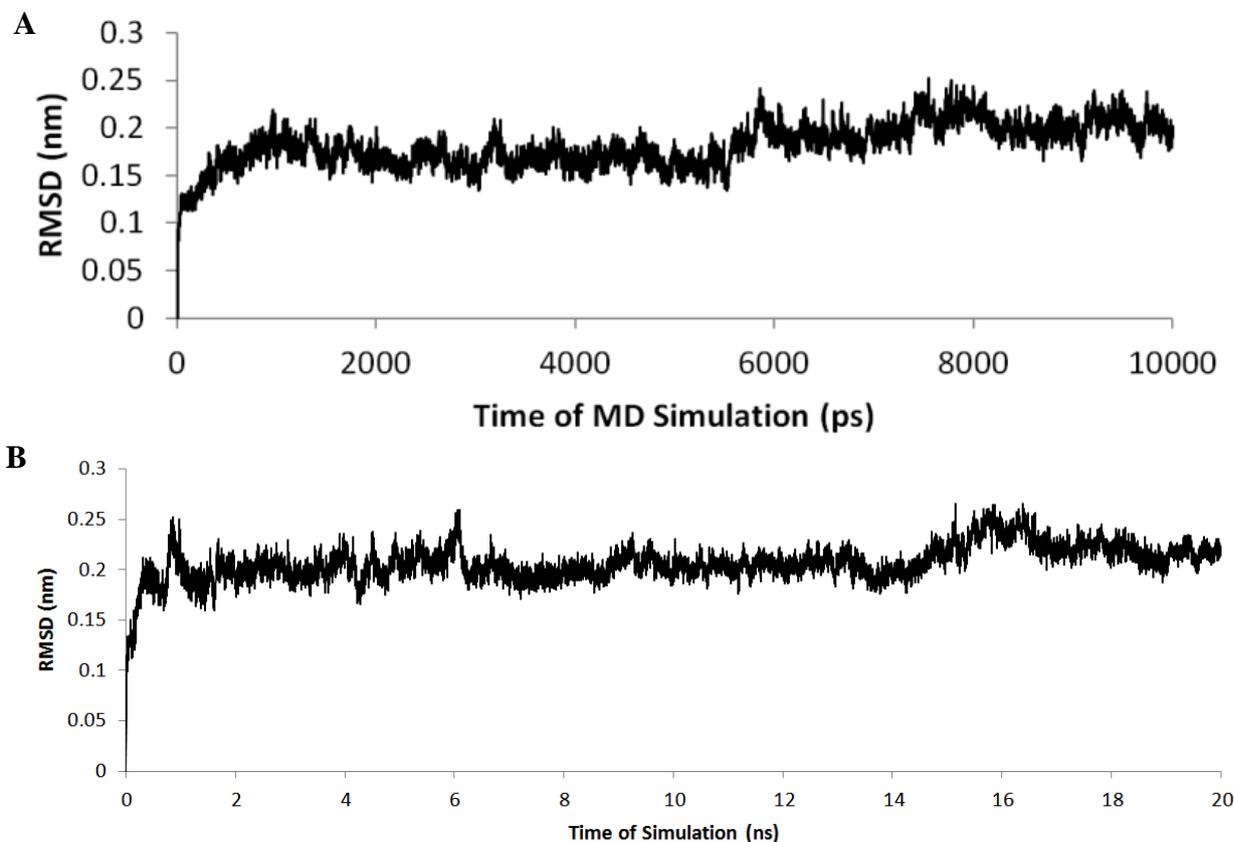


Figura 18 – Simulação de Dinâmica Molecular da Braziliase-I e II (esquerda e direita, respectivamente) utilizando o molde CB PLA₂. (A): São apresentados os valores de RMSD dos átomos da cadeia principal da Braziliase-I ao longo de 10ns de simulação de DM. (B): São apresentados os valores de RMSD dos átomos da cadeia principal da Braziliase-II ao longo de 20ns de simulação de DM.

A partir dos dados da simulação de DM gerou-se os modelos finais de Braziliase-I e II (**Figura 19 e 20**). Com as estruturas das proteínas estabilizadas, pode-se realizar a validação do modelo final gerado. A avaliação utilizando o programa Verify 3D e Pro SA para cada resíduo e SolvX (pontuação geral) apresentou valores inferiores a 0 para os modelos iniciais e finais, indicando uma boa qualidade da técnica de modelagem e dos modelos gerados (**Tabela 6 e 7**).

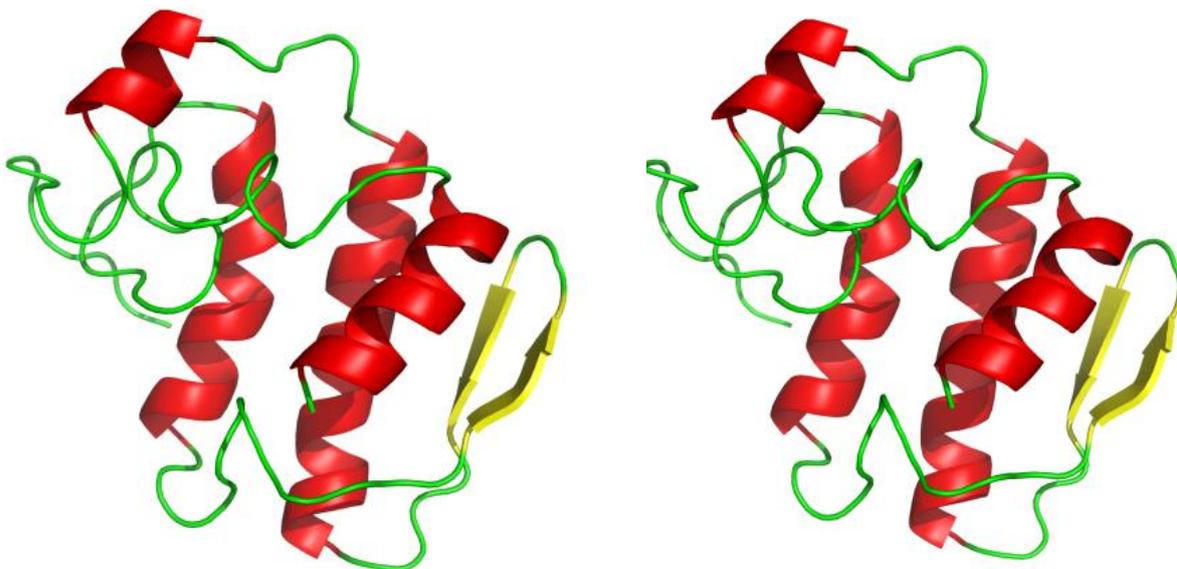


Figura 19 - Visão da estrutura terciária dos modelos inicial e final da Braziliases-I (esquerda e direita, respectivamente). Após a avaliação utilizando os programas Verify 3D e Pro AS observou-se que a simulação DM foi essencial para melhorar a qualidade dos modelos gerados.

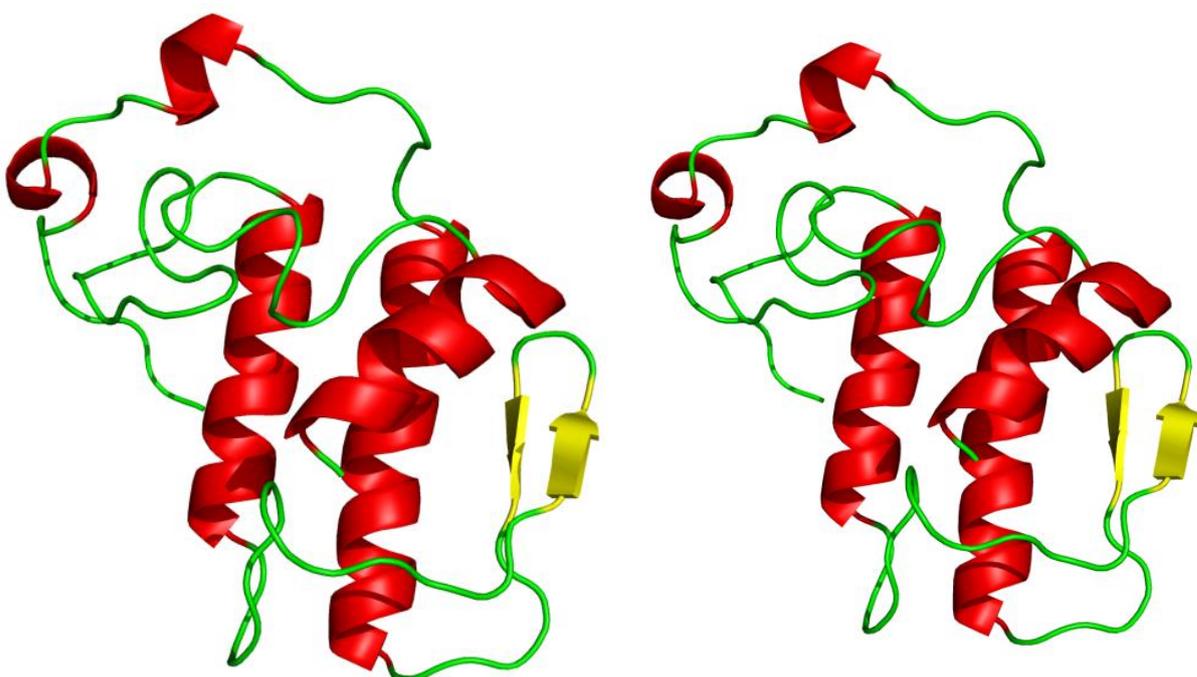


Figura 20 - Visão da estrutura terciária dos modelos inicial e final da Braziliases-II (esquerda e direita, respectivamente). Após a avaliação utilizando os programas Verify 3D e Pro AS observou-se que a simulação de DM foi essencial para melhorar a qualidade dos modelos gerados.

Tabela 6 – Resultados do programa ANOLEA e ERRAT para o modelo inicial e final de Braziliase-I

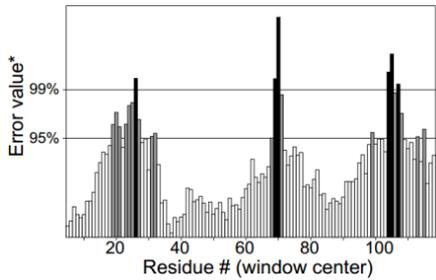
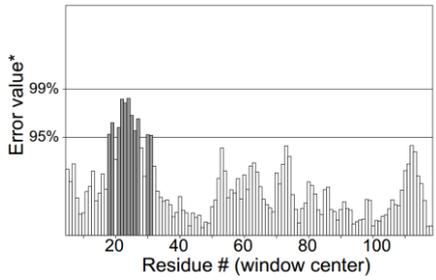
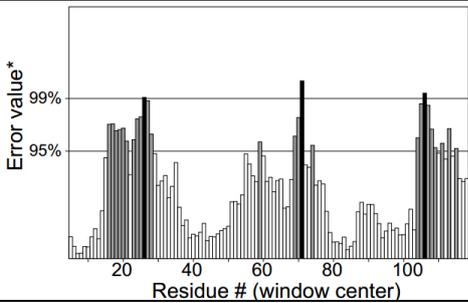
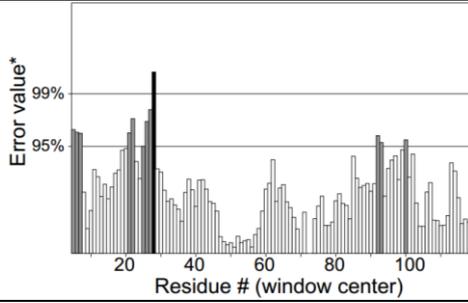
	Modelo Inicial	Modelo Final
ANOLEA	16,39%	9,84%
ERRAT		

Tabela 7 – Resultados do programa ANOLEA e ERRAT para o modelo inicial e final de Braziliase-II

	Initial model	Final model
ANOLEA	23.77%	1.64%
ERRAT		

A simulação de DM causou melhorias em ambas os modelos iniciais das proteínas. Para a Braziliase-I, a simulação DM causou uma melhoria de 6,55% dos resíduos de estrutura de acordo com o seu perfil de energia (ANOLEA) e 9,65% de acordo com o erro de interação dos átomos não ligados (ERRAT) (**Tabela 6**). Em relação a Braziliase-II, o modelo inicial apresentou 23.77% de resíduos com alta energia preditos pelo programa ANOLEA e, após 20ns da simulação de DM, o modelo final apresentou somente 1.64% de resíduos com alta energia (**Tabela 7**). Tais resíduos no modelo final estão localizados em regiões de alça (*loop*) (**figura 21**). A melhoria também foi verificada pelo programa ERRAT. O modelo inicial teve 23 resíduos com valores de erro superior a 95% e 3 resíduos com valor superior a 99%. No modelo final, o número de resíduos com valor superior a 95 e 99% foi reduzida a 11 e 1, respectivamente. Como esperado, a simulação de DM se mostrou uma ferramenta importante no refinamento do modelo.

Finalmente, foi gerado o gráfico de Ramachandran (**figura 21**) dos modelos finais para avaliar a presença de resíduos localizados nas regiões desfavoráveis. A partir dos resultados obtidos, para Braziliase-I, apenas 2 aminoácidos (os resíduos Trp-30 e Asn-70, 1,67% de estrutura), foram considerados em regiões atípicas. No modelo final de Braziliase-II, apenas 2,5% dos resíduos (não-glicina) foram localizados em regiões desfavoráveis. Os aminoácidos em regiões desfavoráveis em ambos os modelos finais estão localizados em regiões de *loop* da proteína, consideradas regiões variáveis.

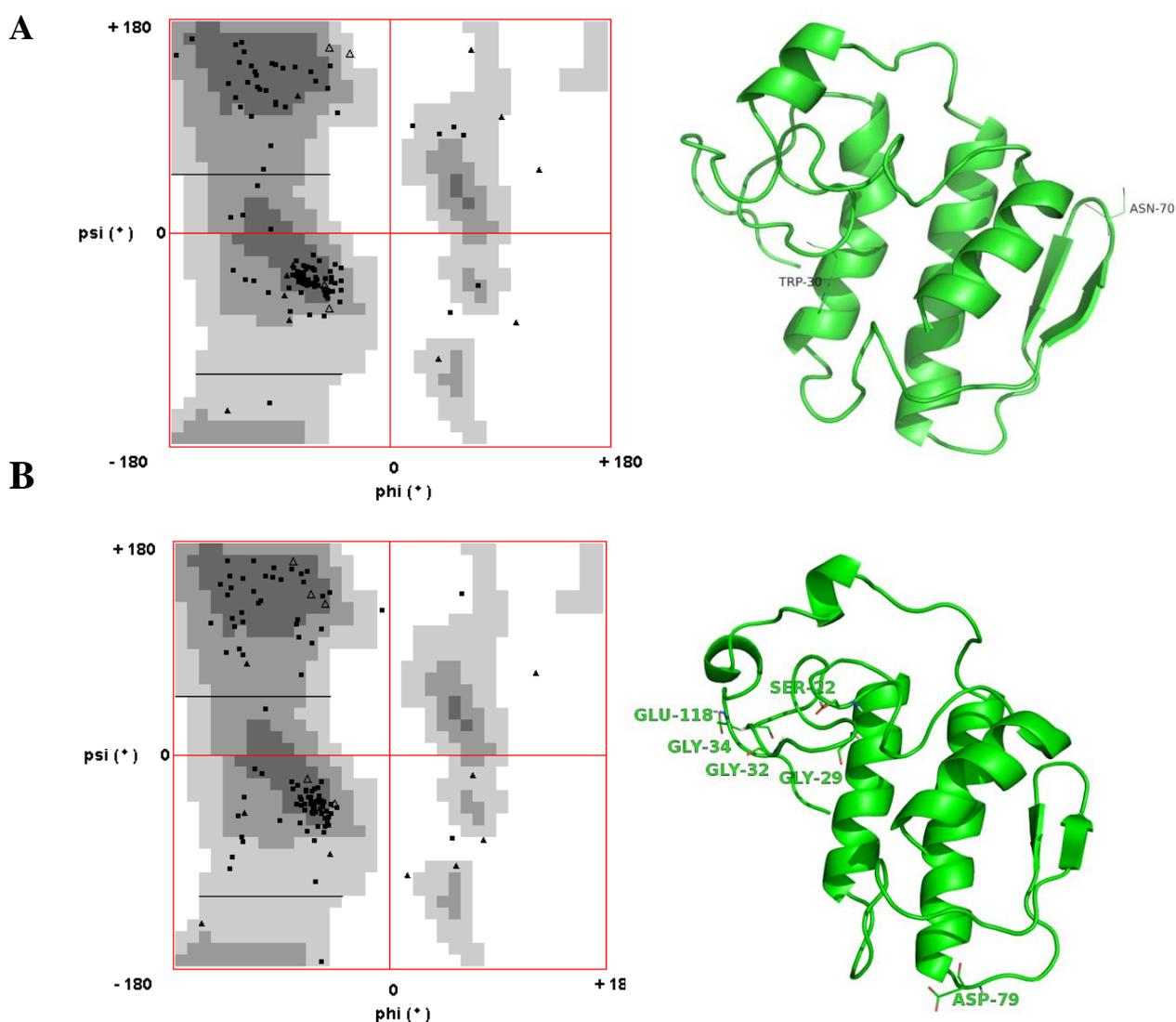


Figura 21 - Gráfico de Ramachandram a partir do modelo teórico de Braziliase-I e II (esquerda e direita, respectivamente). **(A)**: Gráfico de Ramachandram do modelo final de Braziliase-I, apresentando 2 resíduos não-glicina em regiões desfavoráveis. **(B)**: Gráfico de Ramachandram do modelo final de Braziliase-II, apresentando 3 resíduos não-glicina em regiões desfavoráveis.

Os valores RMSF (Raiz Quadrada da Média do Desvio de Flutuação) de carbono α após a estabilização da proteína foram calculados (**Figura 22**) e a partir destes

resultados, pode-se notar que todas as regiões ordenadas (α -hélice e β -folhas) têm valores baixos de flutuação (inferior a 1 Å). O RMSF apresenta o padrão de oscilação da posição dos resíduos de aminoácidos que compõe o modelo teórico, onde observa-se que as flutuações se concentram em regiões de loop, consideradas variáveis.

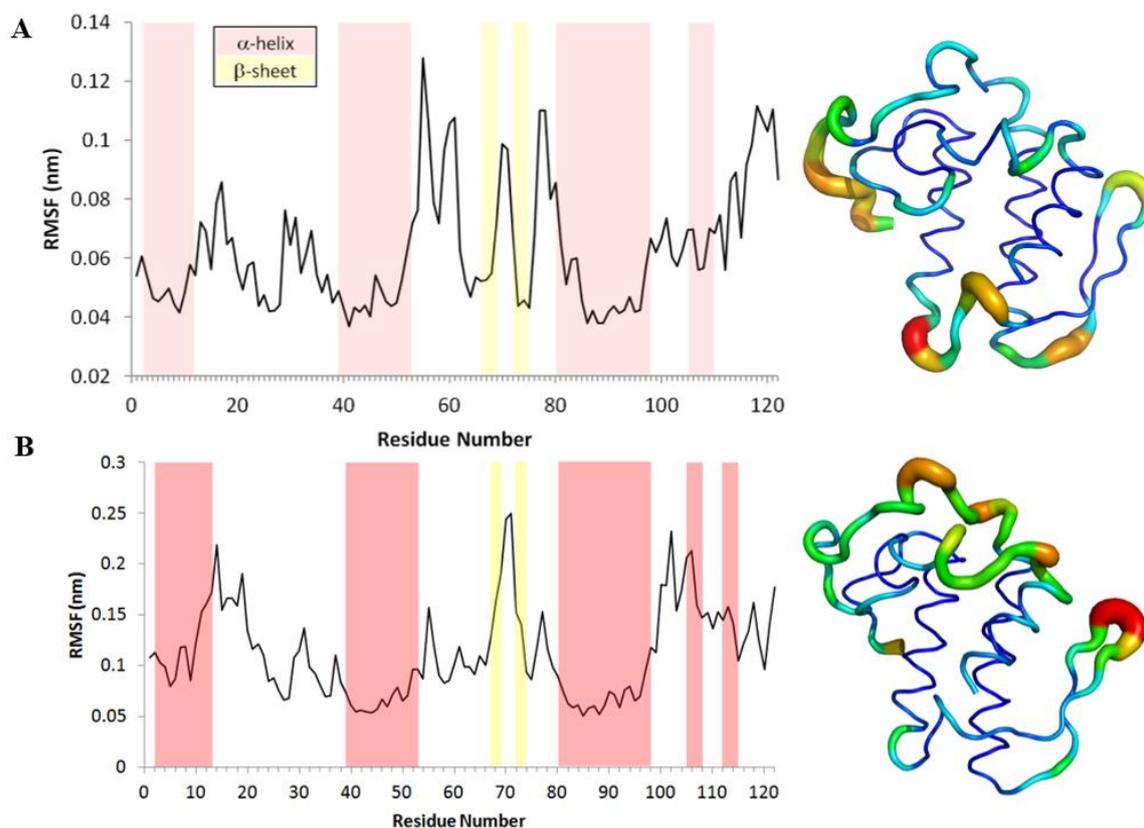


Figura 22 – RMSF por resíduo após a estabilização da estrutura de Braziliase-I e II. **(A)**: O RMSF do modelo final de Braziliase-I. **(B)**: O RMSF do modelo final de Braziliase-II. Ao lado (direito) do gráfico de RMSF é apresentando os resíduos na estrutura tridimensional destacados pelo gráfico de RMSF, apresentando resíduos que mais oscilaram em tons de cores mais intensos.

Na **figura 23** é apresentada a sobreposição de ambos os modelos finais gerados e o molde de CB.

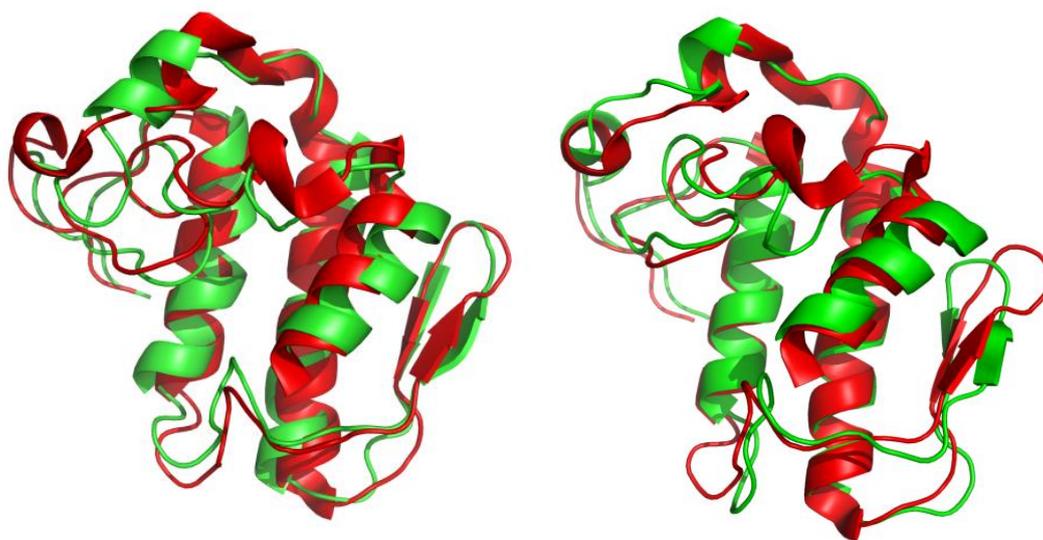
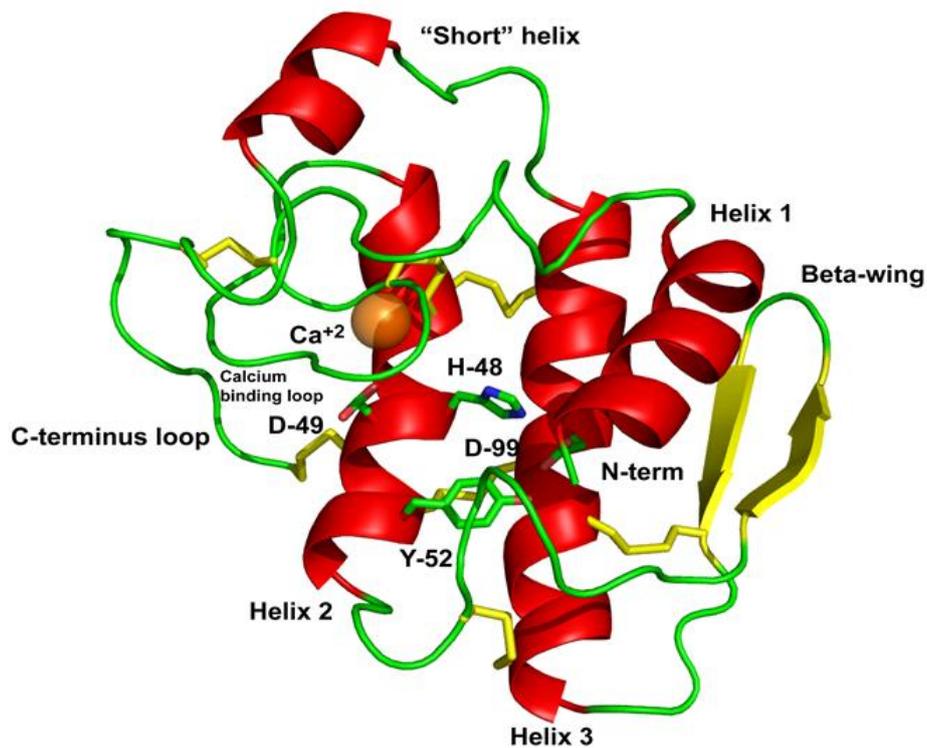


Figura 23 - Sobreposição estrutural do modelo final e o molde CB PLA₂. A Braziliase-I é mostrada na cor verde e o molde em vermelho.

A estrutura tridimensional das Braziliases- I e II apresentou uma estrutura típica de PLA₂s do veneno de serpente (**Figura 24**), que possuem como característica estrutural importante duas α -hélices antiparalelas (resíduos 37 a 54 - Hélice 2 e 90 a 109 - hélice 3) com características anfipáticas. Nestas hélices, os resíduos hidrofílicos estão expostos ao meio aquoso e os resíduos hidrofóbicos internalizados, apontando para o núcleo da proteína. Somente os resíduos polares que compõe o sítio catalítico (His48, Asp49, Asp99 e Tyr52) estão no interior destas α -hélices, constituindo-se em exceções. Além disso, as PLA₂s de veneno de serpentes apresentam na sua região N-terminal, uma α -hélice (resíduos 1 a 12), seguida por uma curta hélice (18 a 23). Contígua, observa-se ainda uma região que compõe o loop ligante de cálcio, cujos resíduos (25 a 33) associados a duas moléculas de água constituem a esfera de coordenação de cálcio formando uma bipirâmide pentagonal. Esta grande alça (ou *loop*) está ligada à α -hélice 2 que por sua vez é sucedida por uma região de β -folhas antiparalelas (β *wing*, constituído pelos resíduos 75 a 77 e 82 a 84). Sucede à região de β *wing*, a α -hélice 3 e uma região extremamente flexível denominada *loop* C-terminal, constituída por aminoácidos básicos e hidrofóbicos, importante para a penetração e desestabilização de membranas.

A



B

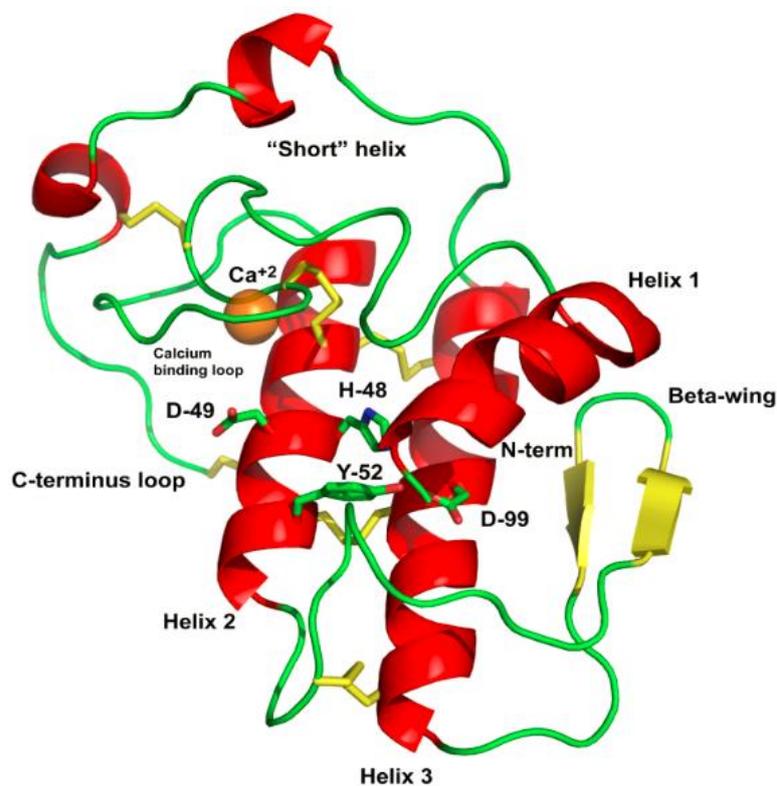


Figura 24 – Modelo tridimensional das PLA_2s ácidas Braziliase-I e II do veneno da serpente *B. brazili*. (A) estrutura terciária teórica de Braziliase-I. (B) estrutura terciária teórica de Braziliase-II. Ambas obtiveram uma conformação típica de PLA_2 do veneno de serpente.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DA ATIVIDADE FOSFOLIPÁSICA SOBRE FOSFOLIPÍDIOS FLUORESCENTES

Realizou-se ensaio de atividade fosfolipásica utilizando-se fosfolipídios fluorescentes (NBD-PC e NBD-PA) com as Braziliases-I e II (**Figura 25**) com o objetivo de avaliar a estabilidade estrutural e funcional, que depende essencialmente de fatores como pH (**Figura 26**), temperatura (**Figura 27**) e cofator (**Figura 28**).

A partir da análise dos resultados, demonstrou-se que as duas enzimas isoladas possuem atividade catalítica pertencendo ao grupo das Asp49, confirmada também pelo sequenciamento de aminoácidos (**Figura 13**). De acordo com a abordagem metodológica empregada, utilizando o substrato NBD-PC (fosfatidilcolina), pode-se verificar que a Braziliase-II apresentou maior atividade enzimática do que a Braziliase-I. Por outro lado, quando utilizado o substrato NBD-PA, não foi detectada atividade enzimática estatisticamente significativa em relação ao controle. Por este motivo, o substrato NBD-PC foi selecionado para os experimentos que avaliaram a estabilidade térmica (a 80°C), variações de pH e influência do Ca^{2+} na atividade enzimática das PLA₂s isoladas.

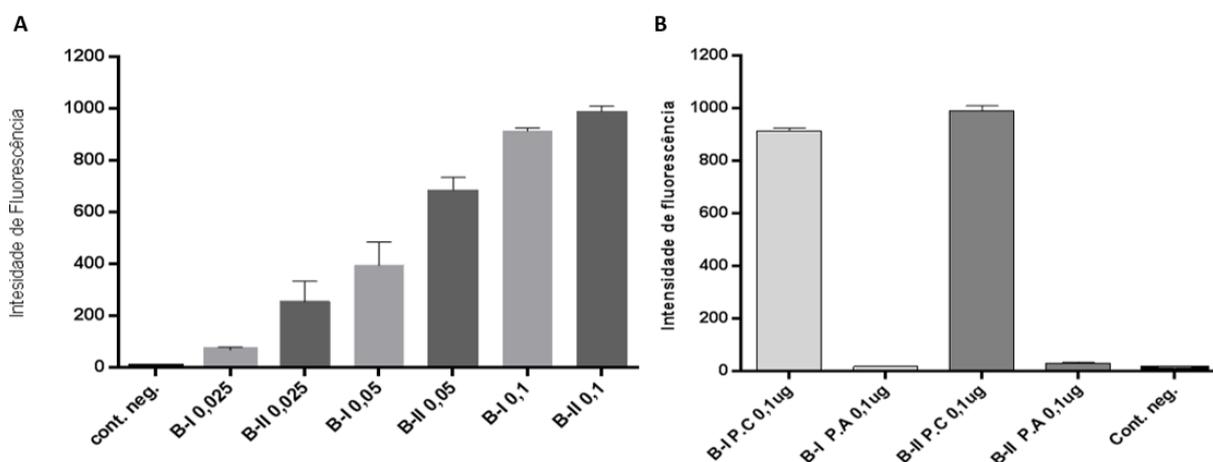


Figura 25 – Atividade fosfolipásica utilizando as PLA₂s isoladas (Braziliase-I e II) e os substratos fluorescentes NBD-PC (fosfatidilcolina) e NBD-PA (ácido fosfatídico). (A): efeito da concentração de enzima (0,025-0,1 µg) na atividade enzimática, utilizando o substrato NBD-PC. (B): Avaliação da atividade enzimática sobre os substratos NBD-PC e NBD-PA.

Nos ensaios de atividade fosfolipásica os métodos mais frequentemente empregados são os que fazem uso de hemólise indireta (resultante da ação do lisofosfolípido), de substrato cromogênico ácido 4-nitro-(3-octanoiloxi) benzóico (4N3OBA) e de substrato fluorescente acil NBD. O método que utiliza substratos

fluorescentes para a avaliação da atividade fosfolipásica destaca-se dos outros, por sua maior sensibilidade, por sua forma mais confiável de mensurar o resultado e por indicar preferência de substrato.

A preferência das PLA₂s de venenos por diferentes substratos fosfolipídicos é determinada pela topologia de superfície específica da região da proteína que interage com a superfície da membrana. Nos grupos I e II (viperídeos) de PLA₂s, esta região é composta por uma superfície hidrofóbica em fenda (altamente conservada) que liga-se a cadeia acil-éster do substrato fosfolipídio juntamente com um anel em torno de resíduos variáveis polares e carregados, formando-se assim o sítio de reconhecimento interfacial (RAMIREZ e JAIN, 1991) também chamado de *face "i"*. Variações na topologia da *face "i"* determinam a especificidade por um ou outro fosfolipídio (YU et al., 2000; TSAI et al., 2006).

A influência do pH sobre a atividade enzimática foi avaliada e os resultados são apresentados na **figura 26**.

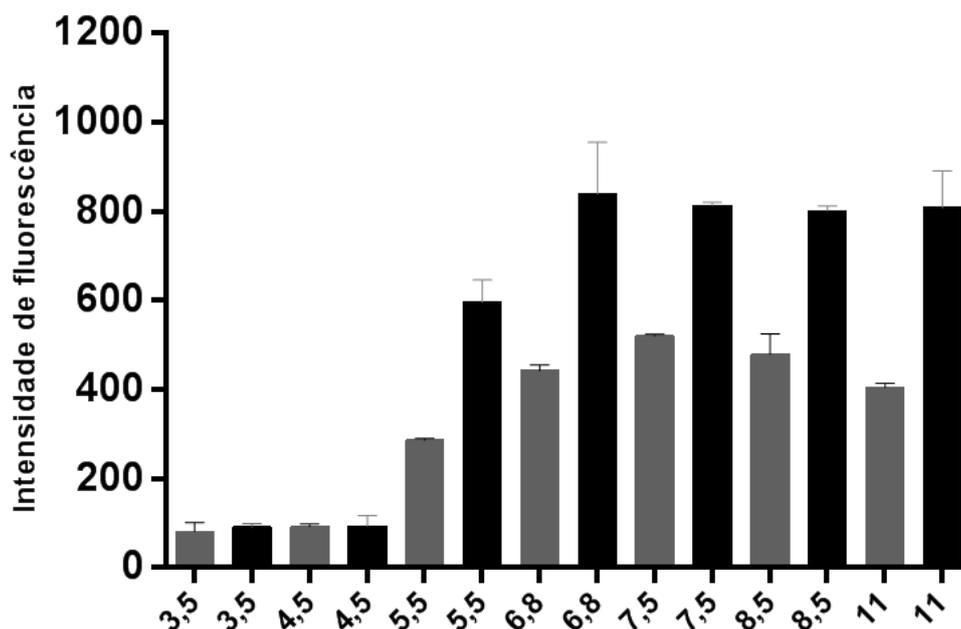


Figura 26 – Avaliação da atividade enzimática de Braziliase-I (cinza) e II (preto) sobre diferentes de pHs. Na faixa de pH que vai de 6,8 a 11 as PLA₂s isoladas apresentaram maior atividade. Utilizou-se o substrato fluorescente NBD-PC e a concentração de 0,05µg das enzimas.

Ambas as PLA₂s isoladas hidrolizaram o substrato NBD-PC em uma ampla faixa de pH (pHs de 6,8 a 11), mantendo quase inalterada a sua atividade enzimática durante este intervalo. Resultado similar é descrito para a PLA₂ ácida de *B. moojeni*

BmooTX-I (SANTOS-FILHO et al., 2008) que apresentou elevada atividade enzimática na faixa de pH de 7 a 11. O mesmo também é descrito para a Bp-PLA₂ de *B. pauloensis* (RODRIGUES et al., 2007).

A exposição das Braziliase-I e II a pHs próximos ou abaixo do seu pI (**Figura 26**), cujos valores são de 5,2 e 5,3 para Braziliase-I e II, respectivamente, reduziram de forma significativa sua atividade enzimática. Nestes valores de pI, as cargas residuais líquidas das moléculas são nulas o que interfere na estabilidade funcional das enzimas, reduzindo sua atividade enzimática.

A atividade enzimática das PLA₂s isoladas também foi analisada a uma temperatura de 80°C (**Figura 27**).

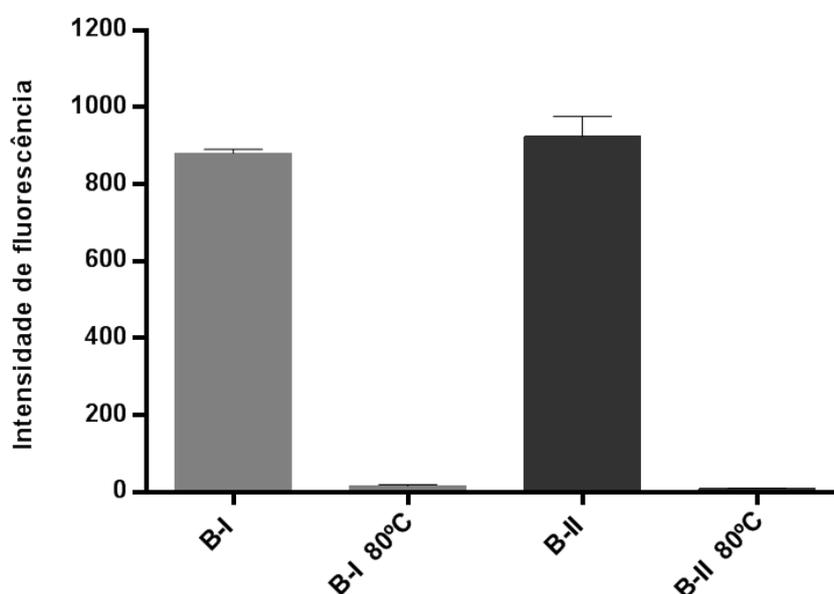


Figura 27 – Análise da temperatura de 80°C na atividade enzimática de Braziliase-I e II. Incubou-se durante 5 min a 80°C 0,1µg das PLA₂s e imediatamente foi feita a leitura em fluorímetro, utilizando o substrato NBD-PC.

Na temperatura de 80°C não foi detectada atividade enzimática estatisticamente significativa, indicando que nesta temperatura a estrutura terciária das PLA₂s isoladas é radicalmente alterada (desnatura), fazendo com que a atividade catalítica seja perdida.

A influência do Ca²⁺ também foi avaliada e é apresentada na **figura 28**.

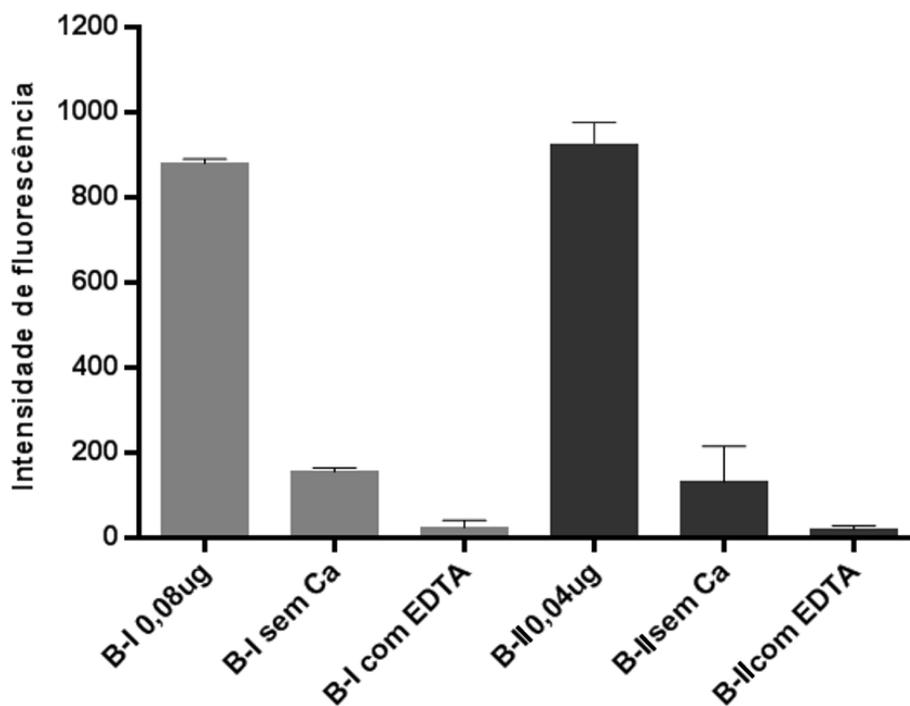


Figura 28 – Análise da influência do Ca^{2+} na atividade enzimática de Braziliase-I e II. Realizou-se um teste sem a adição Ca^{2+} e outro teste adicionando-se um quelante de metais (EDTA 8,3mM) a leitura foi feita em fluorímetro, utilizando o substrato NBD-PC.

No ensaio de atividade enzimática em que não houve a adição de Ca^{2+} observou-se uma redução da atividade enzimática, indicando a importância desse metal para a atividade de hidrólise do substrato pela PLA_2 . O cálcio é fundamental para as PLA_2 s enzimaticamente ativas, pois são requeridos na estabilização da conformação catalítica do sítio ligante do cálcio, o qual é formado pelos resíduos de aminoácidos Tyr28, Gly30, Gly32 e Asp49. Duas moléculas de água completam estruturalmente a esfera de coordenação do cálcio, formando assim uma bi-pirâmide pentagonal. O resíduo Asp na posição 49 é essencial para a ligação do cálcio à proteína (SCOTT e SIGLER, 1994).

No ensaio enzimático onde adicionou-se o EDTA, que é um quelante de metais divalentes, não foi detectada atividade enzimática, indicando que as PLA_2 s na ausência destes metais perdem totalmente sua atividade enzimática.

4.3 CARACTERIZAÇÃO FUNCIONAL

4.3.1 Atividade edematogênica

Para o ensaio de atividade edematogênica foi utilizada a quantidade de 30 μg de Braziliase-I, Braziliase-II e veneno bruto de *B. brazili*. Os dados obtidos foram apresentados em porcentagem de edema (**Figura 29**).

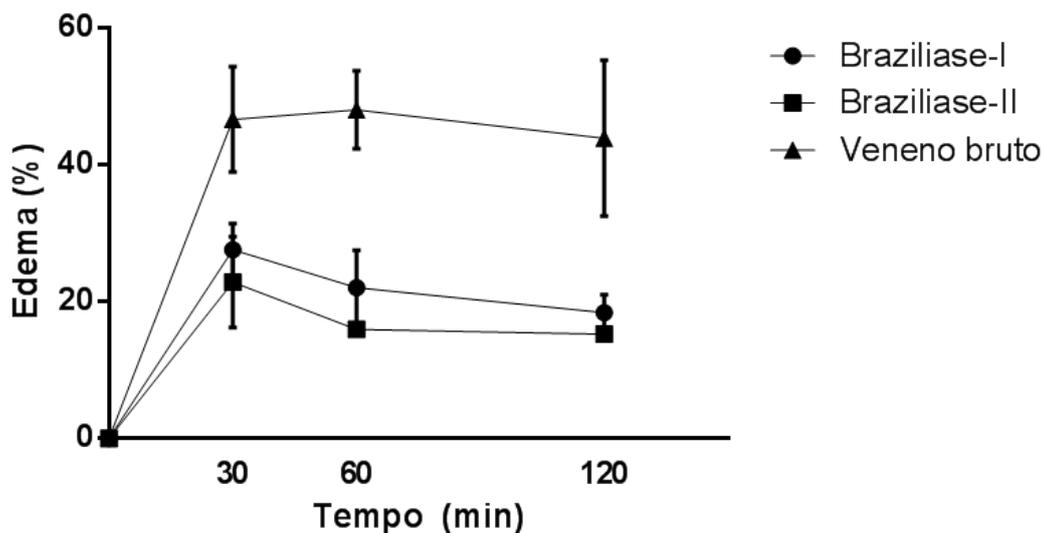


Figura 29 – Atividade edematogênica das Braziliases I e II e do veneno bruto de *Bothrops brazili*. Foi realizada a injeção intraplantar de 50 μ L de volume contendo 30 μ g de cada componente e o grupo controle que recebeu apenas PBS. Para cada valor de espessura da pata foi gerado um número percentual e a partir desses valores foi definida a média (n=4). Para a análise estatística utilizou-se ANOVA e teste de Tukey. Foram considerados como significante a diferença de $P < 0,05$.

Todos os grupos testes apresentaram atividade edematogênica estatisticamente significativa em relação ao controle no tempo de 30 minutos. A Braziliase-I induziu 27,6% de edema e a Braziliase-II 22,8%, não havendo diferença estatisticamente significativa entre ambas. Após o tempo de 30 minutos verificou-se que o edema regrediu, ao ponto de não mais haver diferença estatística em relação ao controle. O veneno bruto alcançou o máximo de edema no tempo de 60 minutos, quando atingiu 48% de edema.

A atividade edematogênica é uma característica comum da resposta inflamatória cutânea e é dependente de um sinergismo entre mediadores que aumentam a permeabilidade vascular. Tal processo decorre de eventos de origem vascular caracterizados pelas seguintes etapas: aumento de fluxo sanguíneo na área lesada (eritema ou rubor) causando, dessa maneira, elevação na temperatura local (calor); aumento na permeabilidade em vênulas pós-capilares ocasionando o extravasamento de proteínas para o espaço intersticial que, somado ao aumento da pressão hidrostática de filtração (devido a vasodilatação) e pressão osmótica intersticial (devido ao acúmulo de proteínas), leva a formação do edema (tumor).

Nos envenenamentos causados por serpentes da família Viperidae é comum o desenvolvimento de edema, que pode ocorrer tanto em seres humanos quanto em animais experimentais. Além de ser responsável por uma perda de líquido significativa, o edema, pode contribuir indiretamente para outros efeitos nocivos do veneno, fazendo com que o tecido sofra compressão e isquemia (LOMONTE, TARKOWSKI e HANSON, 1993). O edema local induzido pelo veneno botrópico pode ser mediado por substâncias vasoativas, tais como histamina e serotonina (CHAVES et al., 1998; TEIXEIRA et al., 2009).

Diversos têm sido os estudos que descrevem as atividades inflamatórias desencadeadas por PLA₂s do veneno de serpentes. Elas induzem o edema e promovem o recrutamento de células inflamatórias. Algumas PLA₂s dos venenos de serpentes também degranulam mastócitos, ativam neutrófilos e são quimiotáticas para células endoteliais (CHACUR et al., 2003; KETELHUT et al., 2003).

Existem estudos que relacionam estreitamente a atividade catalítica e formação do edema. Andrião-Escarso e colaboradores (2000) descreveram que a BthTX-II, uma PLA₂ Asp49 isolada do veneno de *B. jararacussu*, após ser alquilada pelo composto BPB, teve sua atividade edematogênica reduzida em 50%, demonstrando que a atividade catalítica é importante para promover esta ação, não sendo contudo, o único fator envolvido. Diversas PLA₂ ácidas que foram caracterizadas apresentaram atividade edematogênica: BaspPLA₂-II induziu um edema de 60% (FERNANDEZ, et al., 2010), BmooPLA₂ induziu um edema de 68% (SILVEIRA et al., 2013) e BmooTX-I induziu um edema de 60% (TEIXEIRA et al., 2009). Comparado a tais toxinas, verifica-se que o edema induzido pelas PLA₂s isoladas, no presente trabalho, pode ser considerado moderado.

4.3.2 Avaliação da atividade miotóxica

A atividade miotóxica de Braziliase-I e II foi avaliada pela quantificação dos níveis séricos da proteína creatina cinase (CK) 3 horas após a injeção de 50µg das amostras no músculo gastrocnêmio de murinos (**Figura 30**). Como controle positivo da atividade foi também injetado a miotoxina MTX-II (PLA₂ homóloga Lys49 de *B. brazili*) e veneno bruto de *B. brazili*.

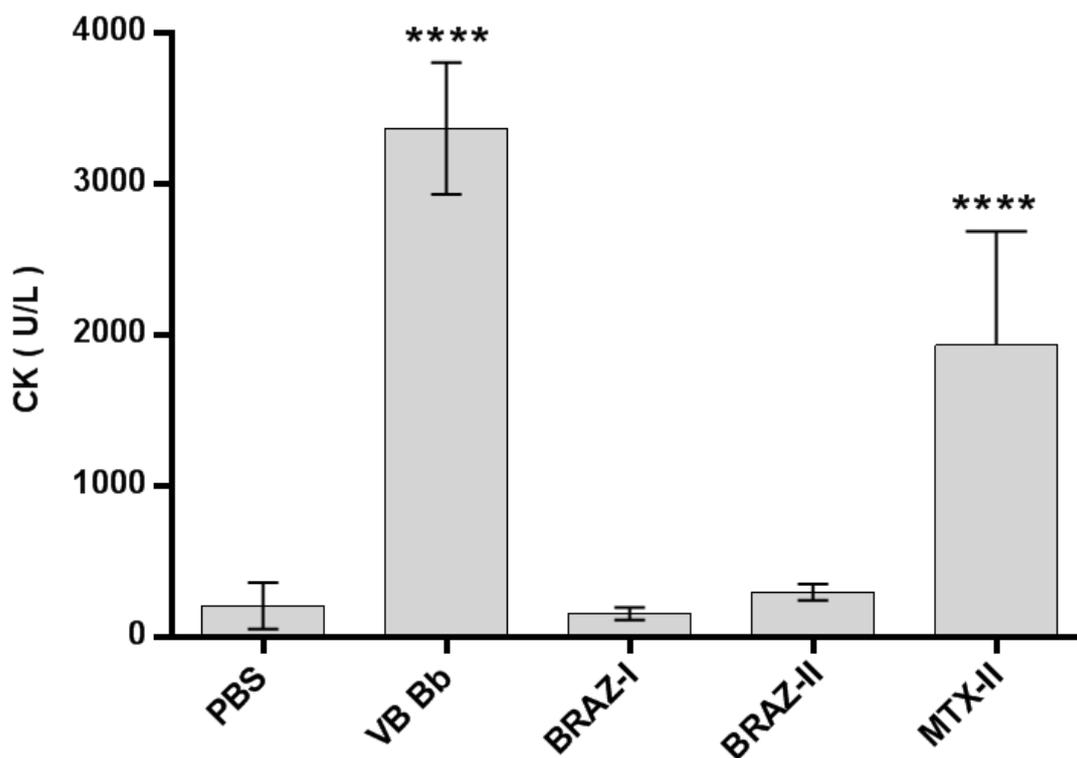


Figura 30 – Avaliação da atividade miotóxica de Braziliase-I e II utilizando 50 µg de proteína. A atividade foi avaliada por meio dos níveis de atividade enzimática da proteína creatina cinase (CK) plasmática após 3 horas. A MTX-II e o veneno bruto de *B. brazili* foram utilizadas como controle positivo da atividade miotóxica e o PBS foi o controle negativo. Não houve diferença estatisticamente significativa nos níveis de CK entre a Braziliase-I e II e o PBS. Os resultados são apresentados como média ± desvio padrão ($P < 0.05$). Para análise estatística utilizou-se ANOVA e teste de Turkey.

A análise do nível de CK sérica induzido pela Braziliase-I e II não apresentou diferença estatisticamente significativa com relação ao controle negativo, demonstrando dessa maneira que as PLA₂s ácidas Braziliase-I e II não são miotoxinas.

A miotoxina MTX-II elevou o nível de CK de forma significativa, representando cerca de 67% do nível induzido pelo veneno bruto de *B. brazili*. Este fato pode indicar que a miotoxicidade provocada durante o envenenamento pela serpente *B. brazili* é induzido principalmente por MTX-II, não havendo indicação que as PLA₂s ácidas isoladas no presente atuem para promover tal efeito. Parte considerável da mionecrose do veneno de *B. brazili* é também induzida pela metaloprotease BbMP-1 isolada e descrita no trabalho de Kayano (2013).

A mionecrose apresenta-se como um efeito local grave nos envenenamentos botrópicos, com a possibilidade de levar à perda permanente de massa muscular ou à amputação, incapacitando a vítima (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; OTERO et al., 2002). A patogênese da mionecrose envolve, primariamente, a combinação das ações

dos diferentes componentes do veneno na musculatura afetada, como fosfolipases A₂ miotóxicas e metaloproteases (ROSENBERG, 1990; OWNBY et al., 1999; GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2000; GUTIÉRREZ, 2002; GUTIÉRREZ e OWNBY, 2003) e, secundariamente, a liberação de mediadores da resposta inflamatória (ROTHSCHILD e ROTHSCCHILD, 1979; SELISTRE et al., 1990; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1995; MILANI-JÚNIOR et al., 1997; JORGE et al., 1999; DA-SILVA et al., 2003).

A miotoxicidade é uma sinal local comum observado nos envenenamentos causados pelo veneno de serpentes do gênero *Bothrops* e é causada tanto por PLA_{2s} Asp49, cataliticamente ativas, quanto por PLA_{2s} Lys49, cataliticamente inativa (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997). No entanto, a miotoxicidade é predominantemente relacionada às PLA₂ Lys49, por mecanismos ainda pouco conhecidos. Estudos demonstram que uma região molecular contendo aminoácidos hidrofóbicos e catiônicos presentes na região C-terminal das PLA_{2s} Lys49 é essencial para sua atividade miotóxica (LOMONTE et al., 2003; 2010). Por outro lado, muitos autores relacionam a atividade catalítica das PLA_{2s} Asp49 à indução da mionecrose. Em busca de informações sobre o mecanismo de ação, há na literatura científica dezenas de estudos que utilizam uma série de técnicas para modificação da estrutura química de PLA_{2s} (OWNBY et al., 1999; MURAKAMI et al., 2005; 2007). Uma das principais estratégias experimentais para o estudo de PLA_{2s} miotóxicas é a modificação química de resíduos de aminoácidos específicos (His, Met, Lys, Tyr, Trp e outros) e da análise dos efeitos consequentes sobre as atividades enzimáticas e farmacológicas, incluindo a mionecrose. O objetivo de tais experimentos é promover a interrupção da atividade enzimática, pois é sabido que o resíduo His48 é fundamental para a região catalítica (WARD et al., 1998). Esta linha de pesquisa tem fornecido informações úteis sobre os determinantes estruturais da ação dessas enzimas e, juntamente com outras estratégias, dão suporte ao conceito da presença de 'sítios farmacológicos' distintos do sítio catalítico de PLA_{2s} miotóxicas do veneno de serpentes. A alquilação de resíduos His48 de PLA_{2s} Asp49 como a Basp-II de *B. asper*, a BthTX-II de *B. jararacussu* e a PrTX-III de *B. pirajai* revelou uma inibição quase completa da atividade miotóxica, demonstrando que His48 é essencial para a hidrólise de fosfolipídios e que este efeito farmacológico depende da atividade catalítica (ANDRIÃO-ESCARSO, et al., 2002; SOARES e GÍGLIO, 2003).

A elucidação do mecanismo de ação das PLA₂ do veneno, bem como dos determinantes estruturais envolvidos, é fundamental para o aperfeiçoamento do tratamento dos acidentes promovidos por serpentes viperídeas.

4.3.3 Ensaio sobre Plaquetas

A Braziliase-II inibiu a agregação plaquetária promovida pelo ADP e colágeno nas duas concentrações utilizadas (5 e 10ug). Entretanto, a Braziliase-I inibiu apenas a agregação plaquetária promovida pelo ADP, o mesmo não quando de utilizou o colágeno como agonista.

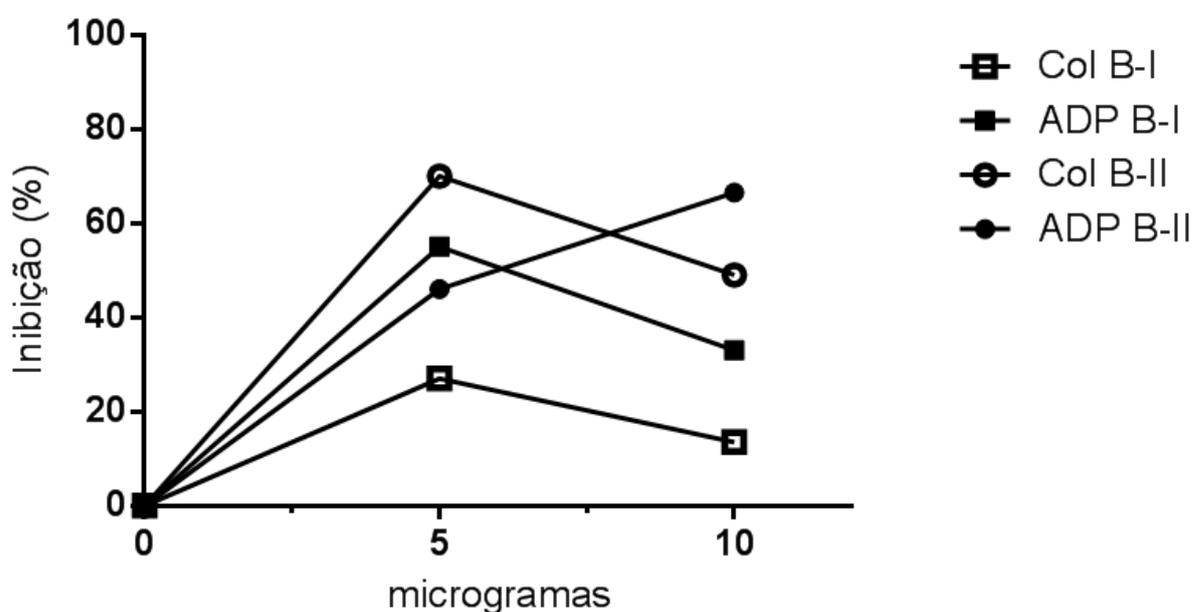


Figura 31 – Ensaio sobre plaquetas utilizando ADP e colágeno como agonista e as PLA₂s isoladas. A Braziliase-I inibiu a agregação plaquetária promovida pelo ADP, porém isto não ocorreu com o colágeno. A Braziliase-II inibiu a agregação plaquetária promovida pelo ADP e colágeno nas duas concentrações utilizadas (5 e 10ug). O ensaio foi monitorado turbidimetricamente e foi considerado como 100% a agregação induzida por ADP e colágeno em uma concentração elevada. O ensaio foi realizado em triplicata.

A hemostasia é definida como o processo fisiológico cujo principal objetivo é a manutenção da integridade vascular e da fluidez do sangue após uma lesão vascular permitindo o equilíbrio do sistema circulatório. Tal processo é dependente de interações complexas entre os vasos sanguíneos, plaquetas, proteínas da coagulação e o sistema fibrinolítico, os quais levam à formação do coágulo sanguíneo e, de maneira igualmente importante, a posterior dissolução do mesmo após o reparo da lesão vascular. Em um funcionamento normal, a superfície endotelial

trabalha a sua função anticoagulante, favorecendo a dilatação vascular e a manutenção da fluidez do sangue. Para tanto, as células endoteliais sintetizam moléculas que exercem o papel de regular o fluxo sanguíneo e inibirem a ativação e agregação das plaquetas. Dentre tais moléculas estão as prostaciclina (PGI_2), prostaglandinas, glicosaminoglicanas (heparan sulfato), óxido nítrico (NO), que atua de forma sinérgica com a PGI_2 , e ectonucleotidases (ecto-ADPase) (RODRIGUES et al., 2012).

Um grande número de proteínas presentes no veneno de serpentes interferem no sistema hemostático. As plaquetas por desempenhar um papel fundamental no controle da hemostasia são dessa maneira um importante alvo de ação dos venenos. Dos componentes do veneno que tem ação sobre as plaquetas, são incluídos aqueles que causam a agregação de plaquetas ou inibem a agregação. Smith e Brinkous (1991) dividiu os agentes que afetam a agregação plaquetária advindos de veneno de serpente em vários grupos: componentes enzimáticos que possuem ação direta sobre as plaquetas, componentes não enzimáticos com ação direta sobre as plaquetas e aqueles componentes que requerem um cofator plasmático. Os autores incluíram as PLA_2 s no primeiro grupo, que ainda pode ser subdividido em mais 3 outros grupos: classe A, são de PLA_2 s que induzem a agregação, classe B, que inibem a agregação e classe C, que tem efeito bifásico que inclui as duas ações em momentos diferentes (MARKLAND, 1998; ANDREWS e BERNDT, 2000). O efeito promovido na agregação plaquetária pelas Braziliases-I e II as classificam na classe B, que inibem a agregação. Vários inibidores plaquetários do veneno de serpente tem sido purificados e caracterizados como, metaloproteinases, desintegrinas, lectinas tipo-C e PLA_2 s. Particularmente, as PLA_2 s ácidas tem sido reportadas com ação inibitória da agregação, contudo, o mecanismo pelo qual estas enzimas alteram a função plaquetária é pouco conhecido.

Acredita-se que as PLA_2 s interfiram na agregação plaquetária por clivarem fosfolípídios da membrana de plaquetas e, dessa forma, culminando na liberação de ácido araquidônico e seus subsequentes metabólitos, como a prostaciclina (prostaglandina I_2 – PGI_2), substância que atua na inibição da agregação plaquetária, e o tromboxano que atua na ativação da agregação (FULY et al., 2004). A hipótese que circunda a PGI_2 foi proposta a partir da observação de que PLA_2 s ácidas inibidoras da agregação plaquetária, induziam a liberação dessa molécula em células endoteliais (MODESTO et al., 2006; SANTOS-FILHO, et al., 2009; SILVEIRA et al., 2013).

Outra vertente para explicar o efeito inibitório promovido pelas PLA₂s é baseada na observação de que algumas PLA₂s dos venenos de serpente e abelha, bem como de PLA₂s pancreáticas poderiam hidrolisar lipoproteínas, principalmente lipoproteína de alta densidade (HDL), que então, geraria lisofosfatidilcolina (lisoPC) capaz de inibir a agregação induzida, principalmente, por colágeno e também por ADP, ácido araquidônico, ionoporo e tromboxana A₂. Além disso, as PLA₂s são capazes de inibir a maioria das respostas plaquetária, como alteração morfológica, liberação de serotonina, geração de TXA₂ e agregação plaquetária via estimulação de adenilil ciclase (YUAN et al., 1995;1996; HUANG e CHIANG, 1994; FULY et al., 1997);

Baseado em dados cristalográficos da estrutura de uma PLA₂ ácida do veneno da serpente *Agkistrodon halys pallas*, Wang e colaboradores (1996) relacionaram um domínio aromático na superfície desta PLA₂, formado pelos aminoácidos aromáticos Phe20, Trp21, Phe113 e Trp119, associado com Glu6 e Asp115, que aparentemente funciona como um domínio ligante e deve estar envolvido com a inibição da agregação plaquetária.

Contudo, muitos estudos tem sido realizados para investigar o mecanismo de ação deste efeito que a exemplo de outros como a miotoxicidade, não são bem conhecidos.

5 CONCLUSÃO

O presente trabalho teve como objetivo a caracterização bioquímica e estrutural de duas PLA₂s ácidas do veneno da serpente *B. brazili* com a finalidade de investigar a participação das mesmas nos efeitos locais (miotoxicidade e edema) induzidos pelo veneno e também investigar, secundariamente, o potencial biotecnológico destas proteínas. Para se alcançar o primeiro objetivo, foi realizada a purificação das proteínas em três etapas cromatográficas: troca catiônica, interação hidrofóbica e fase reversa, a metodologia mostrou-se eficaz na purificação das toxinas com elevada pureza, resultando em duas fosfolipases ácidas denominadas Braziliase-I e Braziliase-II de massas moleculares de aproximadamente 14 kDa. Obteve-se a sequência primária de ambas as proteínas isoladas, onde pode-se confirmar que tratam-se de fosfolipases A₂ da classe Asp49, cataliticamente ativas. Além disso, mostraram elevada similaridade com outras fosfolipases, principalmente com fosfolipases A₂ ácidas de venenos botrópicos. A partir da modelagem molecular utilizando a PLA₂ CB de *C. d. terrificus* demonstrou-se que as estruturas primárias das PLA₂s isoladas foram capazes de adquirir uma conformação típica de PLA₂s de veneno botrópico. O modelo gerado teve sua qualidade validada pelos estudos de dinâmica molecular que demonstraram boa qualidade nos modelos gerados. Obteve-se informações relevantes sobre a função das PLA₂s ácidas isoladas na fisiopatologia do envenenamento causado pela espécie *B. brazili* à medida que a atividade edematogênica foi positiva para ambas as proteínas isoladas e pode-se constatar, por meio dos níveis de CK sérico, que as PLA₂s isoladas não são consideradas miotoxinas e portanto, aparentemente, não desencadeiam, de forma isolada, a necrose do tecido muscular. Ambas as PLA₂s isoladas indicaram apresentar atividade antiplaquetária sobre a agregação induzida por ADP e a Braziliase-II sobre o colágeno também, evidenciando o aspecto biotecnológico das proteínas isoladas que, no entanto, deve ser melhor investigado.

REFERÊNCIAS

- ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; JACINTO, C. N.; SILVA JUNIOR, G. B.; LIMA, J. B.; VERAS, M. S. B.; DAHER, E. F. Acute kidney injury caused by *Crotalus* and *Bothrops* snake venom: a review of epidemiology, clinical manifestations and treatment. **Rev. Inst. Med. Trop. Sao Paulo**, v. 55, n. 5, p. 295-301, 2013
- AEBERSOLD, R. e MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics. **Nature**, v. 422, 2003.
- ALOULO, A.; ALI, Y. B.; BEZZINE, S.; GARGOURI, Y.; GELB, M. H. Phospholipases: an overview. **Methods Mol Biol**, p. 861-63, v. 85, 2012.
- ALVES, R. M. Isolamento e caracterização bioquímica e funcional da L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops atrox*. **Tese de Mestrado**, Universidade de São Paulo (USP), 2007.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; ÂNGULO, Y.; DÍAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Myotoxic phospholipases A₂ in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755-763, 2000.
- ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; CORRÊA, F. M.; ROSA, J. C.; GREENE, L. J.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem Pharmacol.**, v. 64, n. 4, p. 723-32, 2002.
- ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C; FRANÇA, O. S. F; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S; HADDAD, JR. V. Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: **Sarvier**, p. 6-12, 2003.
- ARNI, R. K. e WARD, R. J. Phospholipase A₂ – A structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- BAKER, D. e SALI, A. Protein Structure Prediction and Structural Genomics. **Science**, v. 294, p. 93-96, 2001.
- BERNARDE, P. S. Mudanças na classificação de serpentes peçonhentas brasileiras e suas implicações na literatura médica. **Gaz. méd. Bahia**, v. 81, n. 1, p. 55-63, 2011.
- BERNARDE, P. S.; ALBUQUERQUE, S. D.; TURCI, L. C. B. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos em Rondônia. São Paulo: **Anolis books**, 1ª ed, 2012.
- BERNARDE, P. S.; ALBUQUERQUE, S. D.; BARROS, T. O.; TURCI, L. C. B. A. Serpentes do estado de Rondônia, Brasil. **Biota Neotrop.**, v. 12, n. 3, 2012.

BERENDSEN, H. J. C.; POSTMA, J. P. M.; VAN GUNSTEREN, W. F.; HERMANS, J. Interaction models for water in relation to protein hydration, in: B. Pullman (Ed.), *Intermolecular Forces*. **Reidel, Dordrecht**, p. 331-342, 1981.

BERENDSEN, H. J. C.; VAN DER SPOEL, D. e VAN DRUNEN, R. GROMACS: A message-passing parallel molecular dynamics implementation. **Comp. Phys. Commun.**, v. 91, p. 43-56, 1995.

BÉRNILS, R. S. e H. C. COSTA (org.). 2012. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.2. Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acessada em 20/05/2013.

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

BONAVITA, A. G.; DA COSTA, A. S.; PIRES, A. L.; NEVES-FERREIRA, A. G.; PERALES, J.; CORDEIRO, R. S.; MARTINS, M. A. E.; SILVA, P. M. BÉRNILS, R. S. E H. C. COSTA (org.). 2012. Répteis brasileiros: Lista de espécies. Versão 2012.2. **Brasileira de Herpetologia** Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Sociedade. Acessada em 28/08/2013.

BONAVITA, A. G.; DA COSTA, A. S.; PIRES, A. L.; NEVES-FERREIRA, A. G.; PERALES, J.; CORDEIRO, R. S.; MARTINS, M. A.; SILVA, P. M. Contribution of mast cells and snake venom metalloproteinases to the hyperalgesia induced by *Bothrops jararaca* venom in rats. **Toxicon**, v. 47, n. 8, p. 885-93, 2006.

BOWIE, J. U; LÜTHY, R. e EISENBERG, D. A method to identify protein sequences that fold into a known three-dimensional structure. **Science**. v. 253, n. 5016, p. 164-70, 1991.

BJARNASON, J. B. e FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology & Therapeutics**, v. 62, n. 3, p. 325-372, 1994.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2013. Disponível em http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/Tabela_OBITOS_serpente_2000a2012.pdf. Acessado em 28/08/2013 as 10:05h.

BRASIL. Ministério da Saúde, 2013. Disponível em http://portalsaude.saude.gov.br/portalsaude/arquivos/pdf/2013/Jun/21/Tabela_INCIDENCIACASOS_2000a2012.pdf. Acessado 28/08/2013 as 10:00h.

BURKE, J. e DENNIS, E. Phospholipase A2 Biochemistry. **Cardiovasc Drugs Ther**, v. 23, p. 49-59, 2009.

CAMPBELL, J. E LAMAR, W. The venomous reptiles of Latin America. New York, **Crustock Publishing Associated**, 1989.

CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **J Mass Spectrom**. v. 42, n. 11, p. 1405-14, 2007.

CALVETE, J.J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. **Venoms, venomics, antivenomics**. *FEBS Lett*, v. 583, n. 11, p. 1736-43, 2009.

CHOTIA, C.; LESK, M. The relation between the divergence of sequence and structure in proteins. *EMBO J*. v. 5, p. 823-826, 1986.

COGO, J. C.; LILLA, S.; SOUZA, G. H. M. F.; HYSLOP, S.; NUCCI, G. D. Purification, sequencing and structural analysis of two acidic phospholipases A₂ from the venom of *Bothrops insularis* (jararaca ilhoa). *Biochimie*, v. 88, p. 1947-1959, 2006.

COLOVOS, C. e YEATES, T. O. Verification of protein structures: patterns of nonbonded atomic interactions. *Protein Sci*. v. 2, n. 9, p. 1511-9. 1993.

COLE, R. B. *Electrospray & MALDi Mass Spectrometry : Fundamentals, Instrumentation, Practicalities & Biological Applications*. **WILEY**, 2 Ed, 2010.

CHACUR, M.; LONGO, I.; PICOLO, G.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; GUERRA, J. L.; TEIXEIRA, C. F. P.; CURY, Y. Hyperalgesia induced by Asp49 and Lys49 phospholipases A₂ from *Bothrops asper* snake venom: pharmacological mediation and molecular determinants. *Toxicon*, v. 41, p. 667-678, 2003.

CHAVES, F.; LEON, G.; ALVARADO, V. H.; GUTIERREZ, J. M. Pharmacological modulation of edema induced by lys-49 and asp-49 myotoxic phospholipases A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). *Toxicon*, v. 36, n. 12, p. 1861-1869, 1998.

CLEMENT, H.; OLIVEIRA, V. C. D.; ZAMUDIO, F. Z.; LAGO, N. R.; VALDEZ-CRUZ, N. A.; VALLE, M. B.; HAJOS, S.E.; ALAGÓN, A.; POSSANI, L. D.; ROODT, A. R. D. Isolation, amino acid sequence and biological characterization of na "aspartic-49" phospholipase A₂ from *Bothrops (Rhinocerothis) ammodytoides* venom. *Toxicon*, v. 60, p. 1314-1323, 2012.

DE ARAÚJO, A. L; RADVANYI, F. e BOM, C. Purification of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops lanceolatus* (fer de lance) venom: molecular and enzymatic properties. *Toxicon*, v. 32, v. 9, p. 1069-81, 1994.

DENEGRI, M. E. G.; ACOSTA, O. C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S.; MARUÑAK, S. L.; TEIBLER, G. P.; LEIVA, L. C.; PONCE-SOTO, L. A. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA₂ Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon*, v. 56, p. 64-74, 2010.

DANIELE, J. J.; BIANCO, I. D. e FIDELIO, G. D. Kinetic and pharmacologic characterization of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwiedii* venom. *Arch Biochem Biophys*, v. 318, n. 1, p. 65-70, 1995.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y-H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem. Rev.*, v.111, p. 6130-6185, 2011.

DOS SANTOS, J. I.; SOARES, A. M. e FONTES, M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A(2) from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J Struct Biol.** v. 167, n. 2, p. 106-16, 2009.

ESCOBAR, E.; RODRIGUEZ, E.; YARLEQUE, A. Aislamiento y estudio bioquímico de una proteasa del veneno de *Bothrops brazili*. **Libro Resúmenes V Reunión científica** Del ICBAR UNMSM, v.36, p. 190-8, 1996.

FAURE, G.; XU, H. e SAUL, F.A. Crystal structure of crotoxin reveals key residues involved in the stability and toxicity of this potent heterodimeric. **J. Mol. Biol.** v. 412, p. 176-191, 2011.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J. M.; ÂNGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J. J.; LOMONTE, B. Isolation of an acidic phospholipase A₂ from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, v. 92, p. 273-283, 2010.

FERNANDES, C. A.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCHAHUIRE-VEJA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 12, p. 2772-81, 2013.

FERNANDES, C. A.; GARTUZO, E. C.; PAGOTTO, I.; COMPARETTI, E. J.; HUANCHAHUIRE-VEJA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; COSTA, T. R.; MARANGONI, S.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of three myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops brazili* venom. **Acta Crystallogr Sect F Struct Biol Cryst Commun**, v. 1, n. 68, p. 935-8, 2012.

FISZON, J. T e BOCHNER, R. Subnotificação de acidentes por animais peçonhentos registrados pelo SINAN no Estado do Rio de Janeiro no período de 2001 a 2005. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 11, p. 114-117, 2008.

FRANÇA, F. O. S. e MÁLAQUE, C. M. S., Acidente botrópico. In: CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S., HADDAD, V. (Eds.), Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes, **Sarvier**, São Paulo, p. 72–86, 2003.

FULY, A. L.; SOARES, A. M.; MARCUSSI, S.; GIGLIO, J. R.; GUIMARÃES, J. A. Signal transduction pathways involved in the platelet aggregation induced by a D49 phospholipase A₂ isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 86, p. 731-739, 2004.

GOMES, M. S. R. Purificação e caracterização bioquímica de BthMP: uma nova metaloproteinase do veneno de *Bothrops moojeni* (caiçaca). **Tese de Mestrado**, Universidade de Uberlândia, 2006.

GOPALAKRISHNAN, K.; SOWMIYA, G.; SHEIK, S. S.; SEKAR, K. Ramachandran Plot on The Web (2.0). **Protein & Peptide Letters**. v. 14, n. 7, p. 669-671, 2007.

GUTIÉRREZ, J. M; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M. e LOMONTE, B. Phospholipase A₂ myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405-1424, 1995.

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

GUTIÉRREZ, J. M. e RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p. 841–850, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Venom Phospholipase A₂ Enzymes: Structure, Function, and Mechanism. **John Wiley & Sons**, p. 321-352, 1997.

GUTIÉRREZ, J. M. Envenenamientos por mordeduras de serpientes en América Latina y el Caribe: Una visión integral de carácter regional Snakebite poisoning in Latin America and the Caribbean: An integral view from a regional perspective. **Boletín de malariología y salud ambiental**, v. LI, n. 1, 2011.

GUTIÉRREZ, J. M.; WARRELL, D. A.; WILLIAMS, D. J.; JENSEN, S.; BROWN, N.; CALVETE, J. J.; HARRISON, R. A. The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. **PLOS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1-3, 2013.

HOGÉ, A. R. A new *Bothrops* from Brazil, *Bothrops brazili*, sp. nov. **Mem Inst Butantan**, v. 25, n. 1, p. 15-21, 1953.

HOLM, L. e SANDER, C. Protein structure comparison by alignment of distance matrices. **J. Mol. Biol.** v. 233, p. 123-138, 1993.

HOLM, L. e SANDER, C. Evaluation of protein models by atomic solvation preference. **J Mol Biol**, v. 225, n. 1, p. 93-105, 1992.

HUANCAHUIRE-VEGA, S.; PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. **Toxicon**, v. 54, n. 6, p. 818-27, 2009.

HOLM, L. e SANDER, C. Dali: a network tool for protein structure comparison. **Trends Biochem. Sci.**, v. 20, p. 478-480, 1995.

ISLA, M.; MÁLAGA, O.; YARLEQUÉ, A. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. **Universidad Nacional Mayor de San Marcos**, v. 64, n° 3, p. 159-166, 2003.

JACOB, L. R. Hydrophobic Interaction Chromatography. In KASTNER, M: Protein Liquid Chromatography. **Journal of Chromatography**, v.61, 1999.

JAYASANKAR, J.; PARAMASIVAM, M. A. e SRINIVASAN, T. P. S. Structure of an acidic phospholipase A₂ from Indian saw-scaled viper (*Echis carinatus*) at 2.6Å resolution reveals a novel intermolecular interaction. **Acta Cryst.** v. 60, p. 66-72, 2004.

LOMONTE, B.; TARKOWSKI, A. e HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom. Analysis of edema formation inflammatory cells, and cytokine release in a mouse model. **Inflammation**, v. 17, n. 2, p. 93-105, 1993.

LANGLEY, R. L. Snakebite During Pregnancy: A Literature Review. **Wilderness & environmental medicine**, v. 21, p. 54-60, 2010.

LOMONTE, B. e RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A₂ to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60 520–530, 2012.

LOMONTE, B. e GUTIÉRREZ, J. M. A new muscle damaging toxin, myotoxin II, from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, v. 27, n. 7, p. 725-33.

LINDAHL, E.; HESS, B. e VAN DER SPOEL, D.. GROMACS 3.0: a package for molecular simulation and trajectory analysis. **J. Mol. Mod.** v. 7, p. 306-317, 2001.

LUKASHEVA, E. V.; EFREMOVA, A. A.; TRESHCHALINA, E. M.; ARINBASAROVA, A. I. U.; MEDENTSEV, A. G.; BEREZOV, T. T. L-amino acid oxidases: properties and molecular mechanisms of action. **Biomed Khim.** v. 58, n. 4, p. 372-84, 2012.

LÜTHY, R.; BOWIE, J. U. e EISENBERG, D. Assessment of protein models with three-dimensional profiles. **Nature**, v. 356, n. 6364, p. 83-5, 1992.

KETELHUT, D. F. J.; HOMEM DE MELLO, M.; VERONESE, E. L. G; ESMERALDINO, L. E.; MURAKAMI, M. T.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R.; CINTRA, A. C. O.; SAMPAIO, S. V. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A₂ isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochimie**, v. 85, p. 983-991, 2003.

KUDO, I e MURAKAMI, M. Phospholipase A₂ enzymes. **Prostaglandins & others Lipid Mediators**, v. 3, n. 58, p 68-69, 2002.

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFURST, M.; AU, L. C.; GHISLA, S. L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. **Eur. J. Biochem.**,v. 268 p. 1679-1686, 2001.

MACHADO BRAGA, M. D; COSTA MARTINS, A. M; ALVES, C. D; DE MENEZES, D. B; MARTINS, R. D; FERREIRA BARBOSA, P. S; DE SOUSA OLIVEIRA, I. M; TOYAMA, M. H; TOYAMA, D. O.; DOS SANTOS DIZ FILHO E. B.; RAMOS FAGUNDES, F. H; FONTELES, M. C; AZUL MONTEIRO, H. S. Purification and renal effects of phospholipase A₂ isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, n. 2, p.181-90, 2008.

ISLA, M.; MALAGA, O. e YARLEQUÉ, A. Características bioquímicas y acción biológica de una hemorragina del veneno de *Bothrops brazili*. **Anales de la Facultad de Medicina**, 2003.

MARCUSSI, S.; STÁBELI, R. G.; SANTOS-FILHO, N. A.; MENALDO, D. L.; SILVA PEREIRA, L. L.; ZULIANI, J. P.; CALDERON, L. A.; DA SILVA, S. L.; ANTUNES, L. M.; SOARES, A. M. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. **Toxicon**, v. 65, p. 9-14, 2013.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, n. 12, p. 1749-800, 1998.

MARSH, N. & WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**. v. 45, n. 8, p. 1171-1181, 2005.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MELO, F.; DEVOS, D.; DEPIEREUX, E. e FEYTMANS, E. "ANOLEA: a www server to assess protein structures." **Intelligent Systems for Molecular Biology**, v. 97, p. 110-113, 1997.

NISENBOM, H. E.; SEKI, C.; VIDAL, J. C. Phospholipase A₂ from *Bothrops alternatus* (víbora de la cruz) venom. Purification and some characteristic properties. **Toxicon**, v. 24, n. 3, p. 259-72, 1986.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A₂ proteins. **Toxicon**, v. 37, n. 3, p. 411-45, 1999.

PANTIGOSO, C.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A. Aislamiento y caracterización de una miotoxina del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* Hoge, 1953 (Ophidia: Viperidae). **Rev Peru Biol**, 2001.

QUISPE, A. V. Caracterização estrutural e funcional de uma serinoprotease TLBm, isolada a partir do veneno total de *Bothrops marajoensis*. **Tese de Mestrado**, Universidade Federal de Campinas, 2008.

KORNALIK, F. The influence of snake venom enzymes on blood coagulation. **Pharmac. Ther.**, v. 29, p. 353-405, 1985.

RAMIREZ, F. e JAIN, M. K. Phospholipase A₂ at the bilayer interface. **Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics**, v. 9, n. 4, p. 229-239, 1991.

RODRIGUES, E. S.; CASTILHO-FERNANDES, A.; COVAS, D. T.; FONTES, A. M. Novos conceitos sobre a fisiologia da hemostasia. **Revista da Universidade Vale do Rio Verde, Três Corações**, v. 10, n. 1, p. 218-233, 2012.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F. M.; TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; HAMAGUCHIA, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SELISTRE-DE-ARAUJÓ, H. S.; GIGLIO, J. R.; FULY, A. L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V. M. Isolation and

functional characterization of a new myotoxic acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 153-165, 2007.

SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; OLIVEIRA, C. Z.; BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; FULY, A. L.; ARANTES, E. C.; SAMPAIO, S. Y. V.; MAMEDE, C. C. N.; BELETTI, M. E.; OLIVEIRA, F. D.; SOARES, A. M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I₂ inductor phospholipase A₂ isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJIMURA, Y. Inhibition of human platelet aggregation by l-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, v. 39, p. 1827-1833, 2001.

SILVEIRA, L. B.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVA, F. P. JR.; MARCUSSI, S.; FULY, A. L.; NOMIZO, A.; DA SILVA, S. L.; STÁBELI, R. G.; ARANTES, E. C.; SOARES, A. M. Isolation and expression of a hypotensive and anti-platelet acidic phospholipase A₂ from *Bothrops moojeni* snake venom. **J Pharm Biomed Anal.**, 2012.

SERRANO, S. M; REICHL, A. P; MENTELE, R.; AUERSWALD, E. A.; SANTORO, M. L; SAMPAIO, C. A.; CAMARGO, A. C; ASSAKURA, M. T. A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. **Arch Biochem Biophys.**,v. 367, n. 1, p. 26-32, 1999.

SIX, D. A. e DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SIPPL, M. J. Recognition of Errors in Three-Dimensional Structures of Proteins. **Proteins**, v. 17, p. 355-362, 1993.

SOARES, A. M. Molecular characterization of an acidic phospholipase A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom: synthetic C-terminal peptide identifies its antiplatelet region. **Arch Toxicol**, v. 85, p. 1219-1233, 2011.

SOARES, A. M. e GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A₂ from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. **Toxicon**, v. 42, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M. H; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**, v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M. e GIGLIO, J. R. Phospholipase A₂ Myotoxins from *Bothrops* Snake Venoms: Structure Function Relationship. **Current Organic Chemistry**, 2004.

SOLÍS, C.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A.; GUTIÉRREZ, S. Purificación y caracterización de la Laminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili* "Jergón shushupe". **Rev Peru Biol**, 1999.

SÖDING, J.; BIEGERT, A. e LUPAS, A. N. The HHpred interactive server for protein homology detection and structure prediction. **Nucleic Acids Research**, v. 33, p. 244-248, 2005.

SCOTT, D. L. e SIGLER, P. B. Structure and catalytic mechanism of secretory phospholipases A₂. **Adv Protein Chem**, v. 88, p. 45-53, 1994.

SGRIGNOLLI, L. R.; MENDES, G. E. F.; CARLOS, C. P.; BURDMANN, E. A. Acute kidney injury caused by bothrops snake venom. **Nephron Clin Pract.**, v. 119, n.2, p.131-6, 2011.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. **Biochim Biophys Acta**, v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

SHALTIEL, S. & ER-EL, Z. Hydrophobic Chromatography: Use for Purification of Glycogen Synthetase. **Proc. Nat. Acad. Sci.**, v. 70, n. 3, p. 778-781, 1973.

SHELAT, P. B.; CHALIMONIUK, M.; WANG, J. H.; STROSZNAJDER, J. B.; LEE, J. C.; SUN, A. Y.; SIMONYI, A.; SUN, G. Y. Amyloid beta peptide and NMDA induce ROS from NADPH oxidase and AA release from cytosolic phospholipase A₂ in cortical neurons. **J Neurochem.**, v. 106, n. 1, p. 45-55, 2008.

SCOTT, D. L. e SIGLER, P. B. The structural and functional roles of calcium ion in secretory phospholipases A₂. **Adv Inorg Biochem**. v. 10, p. 139-55, 1994.

STÁBELI, R. G.; SIMÕES-SILVA, R.; KAYANO, A. M.; GIMENEZ, G. S.; MOURA, A. A.; CALDEIRA, C. A. S.; COUTINHO-NETO, A.; ZAQUEO, K. D.; ZULIANE, P. J.; CALDERON, L. A.; SOARES, A. M. Purification of Phospholipasis A₂ from American Snake Venoms. *In*: CALDERON, L. A. Chromatography : the most versatile method of chemical analysis. **Intech**, p. 1-34. , 2012.

TEIXEIRA, C. D. F. P.; FERNANDES, C. M.; ZULIANI, J. P.; ZAMUNER, S. F. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz.**, v. 100, p. 181-184, 2005.

TEIXEIRA, C. F.; LANDUCCI, E. C.; ANTUNES, E.; CHACUR, M.; CURY, Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p.947-62, 2003.

TEIXEIRA, S. S.; SILVEIRA, L. B.; DA SILVA, F. M. N.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SILVA JR, F. P.; IZIDORO, L. F. M.; FULY, A. L.; JULIANO, M. A.; SANTOS, C. R. D.; MURAKAMI, M. T.; SAMPAIO, S. V.; SILVA, S. L. D.; TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a Novel Apoptosis-inducing Factor with L-Amino Acid Oxidase Activity Purified from Western Diamondback Rattlesnake Venom. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 14, p. 9539-9542, 1997.

TEIXEIRA, S. S. Caracterização funcional e estrutural de uma fosfolipase A₂ ácida isolada do veneno de *Bothrops pirajai*. **Tese de Mestrado**. Universidade de São Paulo, 2009.

TEIXEIRA, C.; CURY, Y.; MOREIRA, V.; PICOLO, G.; CHAVES, F. Inflammation induced by *Bothrops asper* venom. **Toxicon**, v. 54, p. 67-76, 2009.

TSAI, Y-C.; YU, B-Z.; WANG, Y.-Z.; CHEN, J.; JAIN, M. K. **Desolvation map of the i-face of phospholipase A₂**. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) – Biomembranes*, v. 1758, n. 5, p. 653–665, 2006.

VYAS, V. K.; BRAHMBHATT, K.; BHATT, H.; PARMAR, U. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pac J Trop Biomed**, v. 3, n. 2, p. 156-162, 2013.

WILLIAMS, A. e FRASCA, V. Ion-Exchange Chromatography. *Current Protocols in Protein Science*, 8.2.1–8.2.30, 2001.

ZAVALETA A. Producción de veneno cristalizado de serpientes en el Instituto Nacional de Salud (Lima-Perú): Período 1970-1986. **Rev Méd Herediana**, p. 3-87, 1992;

ZELANIS, A.; de Souza Ventura J, Chudzinski-Tavassi AM, de Fátima Domingues Furtado M. Variability in expression of *Bothrops insularis* snake venom proteases: an ontogenetic approach. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.**, v. 145, n. 4, 601-9, 2007.

ZULIANI, J. P.; GUTIERREZ, J. M.; SILVA, L. L. C. E; SAMPAIO, S. C.; LOMONTE, B.; TEIXEIRA, C. D. F. P.; COCCUZZO, S. Activation of cellular functions in macrophages by venom secretory Asp-49 and Lys-49 phospholipases A₂. **Toxicon**, v. 46, p. 523-532, 2005.

WANG, Y. M.; WANG, J. M.; PAN, F. M.; TSAI, I. M. Lys-49 phospholipase A₂ homologues from venoms of *Deinagkistrodon acutus* and *Trimeresurus mucrosquamatus* have identical protein sequence. **Toxicon**, v. 34, p. 485-489, 1996.

WHO. Snakebite. Disponível em http://www.who.int/neglected_diseases/diseases/snakebites/en/, acesso em 28/08/2013 as 10:00h.

WIEDERSTEIN e SIPPL. ProSA-web: interactive web service for the recognition of errors in three-dimensional structures of proteins. **Nucleic Acids Research**, v. 35, p. 407-410, 2007.

YU, B. Z.; POI, M. J.; RAMAGOPAL, U. A.; JAIN, R.; RAMAKUMAR, S.; BERG, O. G.; TSAI, M. D.; SEKAR, K.; JAIN, M. K. Structural basis of the anionic interface preference and kcat* activation of pancreatic phospholipase A₂. **Biochemistry**, v. 39, n. 40, p. 12312-23. 2000



COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS
FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ RONDÔNIA

Rua da Beira, 7671 BR364 Km 3,5, CEP 76812-245, Porto Velho, RO, Brazil
Telefone: (55) (69) 3219-6010 - Fax: (55) (69) 3219-6000

CERTIFICADO

Certificamos que o projeto (protocolo 2013/07) intitulado “Avaliação farmacológica e funcional do veneno e toxinas isoladas da serpente *Bothrops brazili* utilizando o modelo murino *Mus musculus* (Swiss)”, sob a responsabilidade do Dr. Andreimar Martins Soares está de acordo com os Princípios Éticos de Experimentação Animal (CONCEA) e foi aprovado pela Comissão de ética no uso de Animais da Fundação Oswaldo Cruz Rondônia (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), em 05 de dezembro de 2013.

This is to certify that the work (protocol 2013/07) entitled “Pharmacological and Functional evaluation of *Bothrops brazili* venom and isolated toxins using the animal model *Mus musculus* (Swiss)”, by Dr. Andreimar Martins Soares is in accordance with the Ethic Principles in Animal Experimental and was approved by Ethic Commission for the Use of Animals of the Oswaldo Cruz Rondônia Foundation (CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA), December 05, 2013.

Porto Velho, 05 de dezembro de 2013.

Dra. Juliana Pavan Zuliani (Presidente CEUA FIOCRUZ RONDÔNIA)
Ms. Luiz Herman Soares Gil
Dr. Andreimar M. Soares
Dr. Roberto Nicoleti
Tatiane Matzkeit