



**UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**



**CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA**

**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E  
MOLECULAR**

**ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOFÍSICOS DE UMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>  
ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops alternatus***

**MICAELA DE MELO CORDEIRO EULÁLIO**

**João Pessoa- PB**

**2020**



UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA



CENTRO DE CIÊNCIAS EXATAS E DA NATUREZA

**ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOFÍSICOS DE UMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub>  
ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops alternatus***

**MICAELA DE MELO CORDEIRO EULÁLIO**

**Docente / Orientadora:** Prof<sup>ª</sup> Dr<sup>ª</sup> Daniela Priscila Marchi Salvador

**Co-orientador:** Dr Guilherme Henrique Marchi Salvador

Laboratório de Cristalografia de Proteínas – CPrLab  
DBM/CCEN/UFPB

Laboratório de Biologia Molecular Estrutural - LBME  
DFB/ IBB/ UNESP

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza, da Universidade Federal da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Biologia Celular e Molecular.

**João Pessoa- PB**

**2020**

E88e Eulálio, Micaela de Melo Cordeiro.

Estudos funcionais e biofísicos de uma fosfolipase A2 isolada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* / Micaela de Melo Cordeiro Eulálio. - João Pessoa, 2021. 76f. : il.

Orientação: Daniela Priscila Marchi Salvador.  
Coorientação: Guilherme Henrique Marchi Salvador.  
Dissertação (Mestrado) - UFPB/CCEN.

1. Biologia celular e molecular. 2. Urutu cruzeiro. 3. Efeito coagulante. 4. Atividade oxidante. 5. Ação catalítica. 6. PLA2 ácida. I. Salvador, Daniela Priscila Marchi. II. Salvador, Guilherme Henrique Marchi. III. Título.

UFPB/BC

CDU 576+577.2(043)

MICAELA DE MELO CORDEIRO EULÁLIO

Dissertação de Mestrado avaliada em 10/12/2020

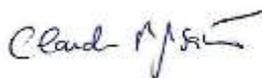
BANCA EXAMINADORA



---

Profa. Dra. Helane Maria Silva da Costa

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba  
(Presidente e Representante da Orientadora Profa. Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador)



---

Prof. Dr. Claudio Roberto Bezerra dos Santos

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba  
(Examinador Interno)



---

Profa. Dra. Juliana Pavan Zuliani

Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular do Instituto Oswaldo Cruz  
(Examinadora Externa)

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu, mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre aquilo que todo mundo vê.”

*Arthur Schopenhauer*

## **Agradecimentos**

Ao programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular (PGBCM), pela oportunidade de realização deste mestrado.

À minha orientadora, Dra. Daniela Priscila Marchi Salvador, por todo o apoio, pela excelente orientação e por todos os ensinamentos transmitidos, tendo sido imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho.

Ao meu co-orientador, Guilherme Henrique Marchi Salvador, por sua disposição e contribuição imprescindível para o desenvolvimento deste trabalho, como também por todo o aprendizado transmitido ao longo de todo o trabalho.

Ao Prof. Dr. Marcos Roberto de Mattos Fontes da Universidade Estadual Paulista (UNESP) em Botucatu e a todos que fazem parte do Laboratório de Biologia Molecular Estrutural – LBME, por disponibilizarem materiais e espaço físico para uma parte desta pesquisa.

Aos meus colegas e amigos do Laboratório de Cristalografia de Proteínas – CPrLab, por todo o apoio e companheirismo.

À professora Paula Helena Santa Rita da Universidade Católica Dom Bosco-UCDB em Campo Grande por disponibilizar a peçonha para este estudo.

À professora Lucilene Delazari dos Santos, pesquisadora credenciada no Centro de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP, UNESP – Botucatu), por sua contribuição em parte deste trabalho.

Aos professores, funcionários e colegas do PPGBCM/UFPB pela convivência e aprendizado ao decorrer deste curso.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão de bolsa que proporcionou suporte financeiro durante o período do curso.

Por último, porém não menos importante, a todos os meus familiares, em especial, minha mãe, Maria José, e meus irmãos, Marcela e Marcelino, por todo o apoio durante este e outros períodos importantes de minha vida e, em memória, ao meu amado pai, Antônio. E também, à minha namorada, Jaltanise, por todo carinho e atenção, e aos amigos que sempre estiveram ao meu lado.

## ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOFÍSICOS DE UMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> ISOLADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops alternatus*

### Resumo

Serpentes do gênero *Bothrops* são de grande interesse científico, médico e social no Brasil, pois são responsáveis pelo maior número dos acidentes ofídicos que ocorrem no país. As toxinas isoladas de peçonhas ofídicas apresentam diversas atividades biológicas e são classificadas em diferentes classes, sendo uma delas as fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), que podem causar uma variedade de alterações fisiológicas ao serem inoculadas em organismos. Este estudo objetivou isolar, caracterizar e avaliar as funções biológicas de uma PLA<sub>2</sub> (BaltAc-PLA<sub>2</sub>) da peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus*, conhecida popularmente como urutu-cruzeiro. A purificação dessa toxina foi realizada usando dois passos de cromatografia líquida (troca iônica e fase reversa). Com o intuito de verificar a pureza das amostras obtidas nos experimentos de cromatografia líquida, géis de poliacrilamida (SDS-PAGE) à 12% (m/v) foram realizados. Ensaio de Espectrometria de Massas, Espectroscopia do Dicroísmo Circular e Espalhamento de Luz Dinâmico foram realizados para a caracterização físico-química da toxina isolada. A ação catalítica da toxina foi avaliada espectrofotometricamente utilizando o substrato Diheptanoil Tio-PC e de modo indireto, com eritrócitos e gema de ovo. Além disso, foram avaliados três potenciais inibidores: varespladib, suramina e ácido rosmarínico. O potencial efeito oxidante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre soluções de hemoglobinas (SolHb) foi realizado utilizando leitor de microplacas (Multiskan GO), nos comprimentos de ondas de 540 e 630 nm. Para avaliar a atividade coagulante, leituras foram feitas com a utilização do equipamento Coagmaster 2.0 (Wama). BaltAc-PLA<sub>2</sub> é uma proteína de caráter ácido e cataliticamente ativa, com uma massa molecular aproximada de 14 kDa estimada por SDS-PAGE. As análises dos fragmentos de íons por MS/MS mostraram uma sequência de aminoácidos do sítio catalítico CCFVHDCCYGK, apresentando homologia com várias PLA<sub>2</sub> de caráter ácido presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*. Estudos estruturais utilizando esta PLA<sub>2</sub> podem auxiliar no desenvolvimento de novos agentes terapêuticos, por possuir potencial científico e tecnológico elevado.

**Palavras-chave:** urutu cruzeiro; efeito coagulante; atividade oxidante; ação catalítica; PLA<sub>2</sub> ácida.

# FUNCTIONAL AND BIOPHYSICAL STUDIES OF A PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> ISOLATED FROM THE VENOM OF SNAKE *Bothrops alternatus*

## Abstract

Snakes of the *Bothrops* genus are of great scientific, medical and social interest in Brazil, because they are responsible for the largest number of snakebites that occurrences in the country. Toxins isolated from snake venoms have several biological activities and are classified in different classes, one being phospholipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), which can cause a variety of physiological changes when inoculated in organisms. This study aimed to isolate, characterize and evaluate the biological functions of a PLA<sub>2</sub> (BaltAc-PLA<sub>2</sub>) from the crude venom of the snake *Bothrops alternatus*, popularly known as urutu-cruzeiro. The purification of this toxin was performed using two chromatography steps (anion exchange and reverse phase). With the intention to verify the purity of the samples obtained in the liquid chromatography experiments, polyacrylamide gels (SDS PAGE) at 12% (w/v) were performed. Mass spectrometry, Circular Dichroism Spectroscopy and Dynamic Light Scattering tests were performed to physico-chemical characterization the isolated toxin. The catalytic action of the toxin was evaluated spectrophotometrically using the substrate Diheptanoyl Thio-PC and indirectly, with erythrocytes and egg yolk. In addition, three potential inhibitors were evaluated: varespladib, suramine and rosmarinic acid. The potential oxidizing effect of BaltAc-PLA<sub>2</sub> on hemoglobin solutions (SolHb) was performed using microplate reader (Multiskan GO) in wavelengths of 540 and 630 nm. To assess the coagulant activity, readings were made using the Coagmaster 2.0 (Wama) equipment. BaltAc-PLA<sub>2</sub> is an acidic character and catalytically active protein, with an approximate molecular mass of 14 kDa estimated by SDS PAGE. The analysis of ion fragments by MS / MS showed an amino acid sequence from the catalytic site CCFVHDCCYGK, presenting homology with several PLA<sub>2</sub> of acid character present in venoms of snakes of the genus *Bothrops*. Structural studies using this PLA<sub>2</sub> can assist in the development of new therapeutic agents, for possessing high scientific and technological potential.

**Keywords:** urutu cruzeiro; coagulant effect; oxidizing activity; catalytic action; Acidic PLA<sub>2</sub>.

## Lista de Abreviaturas e Siglas

ACN	Acetonitrila.
Asp49-PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> que possui um resíduo de ácido aspártico na posição 49.
CaCl <sub>2</sub>	Cloreto de cálcio.
CD	Dicroísmo Circular.
DLS	Espalhamento de Luz Dinâmico do inglês ‘Dynamic Light Scattering’
LAAO	L-aminoácido oxidase.
Lys49-PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> que possui um resíduo de lisina na posição 49.
PLA <sub>2</sub>	Fosfolipase A <sub>2</sub> do inglês Phospholipase A <sub>2</sub> .
mAU	Mili Unidade de absorvância.
mL	Militro.
mM	Milimolar.
PBS	Solução Salina Tamponada, do inglês Phosphate Buffered Saline.
PB	Tampão Fosfato, do inglês Phosphate Buffer.
PEG	Polietileno glicol.
pH	Potencial Hidrogeniônico.
SDS-PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio, do inglês Sodium Dodecyl Sulfate, Polyacrylamide Gel Electrophoresis.
SE	Suspensão de Eritrócito.
ST	Sangue Total
svMPs	Metaloproteinases de veneno de serpentes
svSPs	Serinoproteinases de veneno de serpentes
µg	Microgramas.
µL	Microlitro.

## Lista de Figuras

- Figura 1 -** Composição proteica da peçonha de *Bothrops alternatus*. Serinoproteases (svSPs); fosfolipases (PLA<sub>2</sub>s); metaloproteases (svMPs); L-aminoácido oxidases (LAAOs)..... 17
- Figura 2 -** Mecanismo de ação das PLA<sub>2</sub>s secretadas. Interação do íon cálcio com o Asp<sup>49</sup> do sítio catalítico de sPLA<sub>2</sub>s e substrato. **E\*** a superfície de interface da proteína livre que está interagindo com a membrana biológica, **E\*S** enzima com o substrato, **E\*TI** forma intermediária, **E\*P** é a enzima e o produto da catálise..... 19
- Figura 3 -** Cromatograma da cromatografia líquida de troca iônica (DEAE Sepharose) em um gradiente crescente de 0 a 100% de 20 mM de Tris HCl (pH 8,0) + NaCl (1M), resultando em seis frações principais, nomeadas de A1 a A6..... 30
- Figura 4 -** Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE a 12%). Frações obtidas na cromatografia líquida de troca iônica (A1 - A6). A3: Fração com maior quantidade de fosfolipase A<sub>2</sub>. MM: Massa Molecular (PageRuler Plus™, Thermo Scientific™). \*flowthrough..... 31
- Figura 5 -** Cromatografia líquida de fase reversa. (A) Cromatograma com gradiente crescente de 0 a 100% do tampão de eluição (66,5% de Acetonitrila diluída em 0,1% de TFA). (B) SDS-PAGE a 12%, única fração observada apresentou massa molecular de ~ 14 kDa, correspondente a uma PLA<sub>2</sub>, a qual foi denominada BaltAc-PLA<sub>2</sub>. MM: Massa Molecular (PageRuler Plus™, Thermo Scientific™)..... 32
- Figura 6 -** Alinhamento da sequência parcial de BaltAc-PLA<sub>2</sub> com a sequência de uma fosfolipase ácida de *Bothrops alternatus*..... 33
- Figura 7 -** Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da BaltAc-PLA<sub>2</sub> com outras PLA<sub>2</sub>s ácidas ofídicas. Banco de dados utilizado: Swiss-Prot → *Bothrops* → Fosfolipases A<sub>2</sub>..... 34
- Figura 8 -** Comparação entre os espectros de dicroísmo circular da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (0,5 mg/ml) solubilizada em bicarbonato de amônio (A) e BthTX-II (B)..... 34
- Figura 9 -** Distribuição monomodal da BaltAc-PLA<sub>2</sub> a 3 mg/mL, solubilizada em formato de amônio, pH 3,5..... 35

- Figura 10** - Cristais da BaltAc-PLA<sub>2</sub> obtidos em temperatura constante de 18°C após aproximadamente 20 dias. (A) Policristais formados na condição contendo cloreto de magnésio hexahidratado, Bis-tris e PEG 3350. (B) Monocristais obtidos na condição contendo fosfato di-amônio e acetato de sódio..... 36
- Figura 11** - Atividade catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> representada através do aumento da absorbância a 414 nm devido à liberação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico. Bee: fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha (controle positivo); VB: peçonha bruta de *Bothrops alternatus*; BaltAc-PLA<sub>2</sub> em duas concentrações diferentes (10 e 20 µg)..... 37
- Figura 12** - Avaliação da atividade fosfolipásica indireta da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre eritrócitos e gema de ovo após 19 horas e 38 horas de experimento. **1. (a)** Controle negativo, PBS; **(b)** BaltAc-PLA<sub>2</sub> (0,5 mg/ml). **2. (a)** Varespladib sozinho; **(b)** BaltAc-PLA<sub>2</sub> + Varespladib. **3. (a)** Suramina sozinho; **(b)** BaltAc-PLA<sub>2</sub> + Suramina. **4. (a)** Ácido Rosmarínico sozinho; **(b)** BaltAc-PLA<sub>2</sub> + Ácido Rosmarínico..... 38
- Figura 13** - Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (1, 5 e 10 µg) e pela quantidade de 10 µg da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos humano tipo O+ (solHb-CE) a 5%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média..... 40
- Figura 14** - Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (1, 5 e 10 µg) e pela quantidade de 10 µg da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes do sangue total humano do tipo O+ (solHb-ST) a 10%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média..... 41
- Figura 15** - Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos humano do tipo O+ (solHb-CE) a 5%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média..... 42

- Figura 16 -** Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de sangue total humano do tipo O+ (solHb-ST) a 10%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média..... 43
- Figura 17 -** Avaliação da atividade coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> em cinco diferentes quantidades (11,2; 22,4; 33,6; 44,8 e 89,6  $\mu$ g). TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de  $p > 0,05$ . Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos (\*: valor de  $p < 0,01$ ; \*\*: valor de  $p < 0,001$ ; \*\*\*: valor de  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*: valor de  $p < 0,00001$ )..... 44

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1 -</b>	Fosfolipases $A_2$ identificadas no <i>Universal Protein Resource</i> , que compartilham da sequência experimental da BaltAc-PLA <sub>2</sub> .....	32
<b>Tabela 2 -</b>	Diâmetro do halo de catálise formado pela ação catalítica da BaltAc-PLA <sub>2</sub> .....	38

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	15
1.1 Serpentes do gênero <i>Bothrops</i> e componentes da peçonha.....	16
1.2 Fosfolipases A <sub>2</sub> .....	18
<b>2 OBJETIVOS</b> .....	21
Objetivos Gerais.....	19
Objetivos Específicos.....	19
<b>3 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	22
3.1 Obtenção das amostras e aspectos éticos.....	22
3.2 Caracterização Físico-Química.....	22
3.2.1 Purificação.....	22
3.2.2 Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE).....	23
3.2.3 Espectrometria de Massas.....	24
3.3 Caracterização Biofísica.....	25
3.3.1 Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....	25
3.3.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....	26
3.3.3 Cristalização da proteína.....	26
3.4 Atividade Enzimática e Biológica.....	27
3.4.1 Atividade catalítica.....	27
3.4.2 Atividade oxidante.....	28
3.4.3 Atividade coagulante.....	29
<b>4 RESULTADOS</b> .....	30
4.1 Caracterização Bioquímica.....	30

<b>4.1.1</b>	<b>Purificação e SDS-PAGE.....</b>	<b>30</b>
<b>4.1.2</b>	<b>Espectrometria de massas.....</b>	<b>32</b>
<b>4.2</b>	<b>Caracterização Biofísica.....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.1</b>	<b>Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD).....</b>	<b>34</b>
<b>4.2.2</b>	<b>Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS).....</b>	<b>35</b>
<b>4.2.3</b>	<b>Cristalização da Proteína.....</b>	<b>35</b>
<b>4.3</b>	<b>Atividades Enzimática e Biológicas.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.1</b>	<b>Atividade catalítica.....</b>	<b>36</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Atividade oxidante.....</b>	<b>39</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Atividade coagulante.....</b>	<b>43</b>
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>45</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>51</b>
<b>7</b>	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>52</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>62</b>

## 1. INTRODUÇÃO

Acidentes causados por serpentes são um problema de saúde pública que afeta, principalmente, países de clima tropical, subtropical e áreas rurais de países da África, Ásia, Oceania e América Latina (WHO, 2014). O risco de acidentes ofídicos é uma preocupação diária, especialmente para as comunidades rurais e peri-urbanas, nas quais centenas de milhões de pessoas dependem da agricultura ou da caça de subsistência para sobreviver (OMS, 2019a). Apesar dos acidentes ofídicos serem de grande importância nestas regiões, somente a partir de junho de 2017, o ofidismo foi incluído na lista de Doenças Tropicais Negligenciadas da Organização Mundial da Saúde (OMS, 2019b; CHIPPAUX, 2017). Acidentes ofídicos causam mais óbitos do que algumas doenças presentes na lista de doenças negligenciadas da OMS como dengue, cólera, leishmaniose, esquistossomose, encefalite japonesa e doença de chagas (WILLIAMS, 2010).

Estima-se que 5,8 bilhões de pessoas vivem em áreas onde o ofidismo apresenta ocorrência relativamente comum. Anualmente, 1,8 a 2,7 milhões de pessoas são acometidas pelo ofidismo e, dessas, entre 90-138 mil progridem para o óbito (SILVA; ISBISTER, 2020). O Brasil está entre os cinco países da América Latina com maiores estimativas mundiais para acidentes ofídicos e, na América do Sul, apresenta o maior índice de empecoamento, com aproximadamente 29 mil casos ao ano (SANTOS, 2018; BERNARDE, 2014). No Brasil, dos 30.482 casos de ofidismo registrados no ano de 2019, 8.557 ocorreram na região Nordeste, sendo destes, 4.569 ocasionados pelo gênero *Bothrops* (BRASIL, 2019). As serpentes do gênero *Bothrops* são distribuídas em todo o território nacional, apresentando maior relevância devido à sua extensa distribuição geográfica e, conseqüentemente, apresentam maior incidência nos casos notificados de acidentes ofídicos, com 68,55% e letalidade de 0,31% (BRASIL, 2018; 2019).

Um dos principais problemas associados ao envenenamento botrópico é o proeminente dano local causado pela picada que, em casos mais severos, pode evoluir para necrose e amputação do membro afetado (GUTIERREZ *et al.*, 2006). Isbister e Silva (2018) relataram que pessoas acometidas pelo ofidismo podem apresentar problemas psicológicos e econômicos, a exemplo de pacientes no Sri Lanka que apresentaram sintomas de depressão e transtorno pós-traumático, onde cerca de 10% não voltaram ao trabalho, consistindo também em um fardo econômico substancial para o país.

Atualmente, a administração do soro antiofídico consta como único tratamento específico disponível para o empecoamento por serpentes (GUTIERREZ *et al.*, 2006). A produção de antivenenos no Brasil é restrita a três laboratórios oficiais: Instituto Butantan – IB, São Paulo (SP), Instituto Vital Brazil – IVB, Niterói, Rio de Janeiro (RJ) e Fundação Ezequiel Dias – FUNED,

Minas Gerais (MG), os quais têm trabalhado na elaboração de soros cada vez mais eficazes e específicos para combater os efeitos da peçonha de diversos gêneros de serpentes (QUEIROZ, *et al.*, 2008). O soro antiofídico é composto por imunoglobulinas purificadas, que são posteriormente reduzidas a fragmentos F(ab')<sub>2</sub> para diminuir os efeitos adversos (KUNIYOSHI, *et al.*, 2019). Apesar do sucesso dessa terapia na neutralização das toxinas responsáveis pelos efeitos sistêmicos do empeçonhamento, o soro apresenta limitada eficácia na proteção contra toxinas que estabelecem lesões locais (edemas, necrose de tecidos, hemorragia local e reações inflamatórias), podendo deixar os membros atrofiados ou causar amputação (WARRELL, 1992).

Devido à significância e o impacto social que o empeçonhamento por serpentes causa, justifica-se a necessidade da realização de estudos que visem produzir soros antiofídicos mais específicos no tratamento dos efeitos locais causados pelo ofidismo. Além disso, a busca por moléculas que proporcionem um melhor êxito na terapia atual se faz necessária, bem como desenvolver estratégias complementares a soroterapia convencional (SILVA, ISBISTER, 2020; WILLIAMS *et al.*, 2011). O uso de técnicas de biologia molecular como a purificação, sequenciamento proteico, elucidação estrutural e análises *in silico* (ferramentas computacionais), como avaliação de efeitos tóxicos e farmacológicos, para compreender os mecanismos de ação das toxinas ofídicas, são apenas algumas vias importantes para estudos desta natureza.

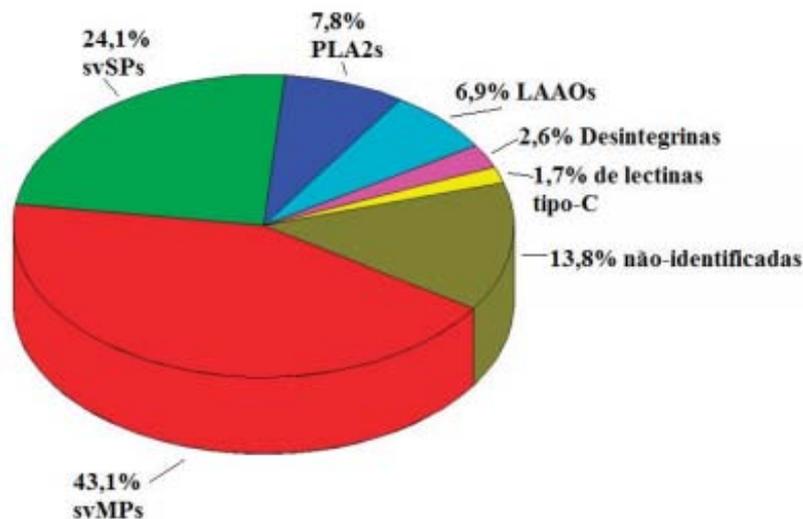
### **1.1 Serpentes do gênero *Bothrops* e componentes da peçonha**

As serpentes do gênero *Bothrops* estão classificadas na família Viperidae, subfamília Crotalinae, sendo a *Bothrops alternatus* uma espécie representante desse gênero (ARAÚJO *et al.*, 2003). A *B. alternatus*, popularmente conhecida por urutu cruzeiro ou cruzeiro do sul, apresenta ampla distribuição geográfica, incluindo a região sul (Rio Grande do Sul, Paraná e Santa Catarina), sudeste (São Paulo e Minas Gerais) e centro oeste (Mato Grosso) do Brasil, região central da Argentina e limite meridional do Uruguai, ocupando predominantemente áreas abertas (SOERENSEN, 2000; CAMPBELL, LAMAR, 1989). Esta serpente tem o comportamento terrestre, possui o corpo robusto e pode atingir cerca de 1,7 metros de comprimento (ROCHA, 2005). A urutu cruzeiro é conhecida por causar acidentes graves, nos quais se aplica o ditado: “A urutu quando não mata, aleija” (PEREIRA, 1940).

As peçonhas ofídicas são compostas por uma combinação complexa de substâncias farmacológicas e bioquimicamente ativas, sintetizadas e armazenadas em glândulas especializadas, as quais se ligam às presas através de dutos (ALAPE-GIRÓN *et al.*, 2008; CALVETE *et al.*, 2009; ZAQUEO, 2011). Entre 90 a 95% do peso seco das peçonhas ofídicas é composto por proteínas. Estas proteínas, quando inoculadas em organismos vivos, desencadeiam

uma variedade de ações fisiológicas, sendo as maiores responsáveis pelos efeitos tóxicos e farmacológicos desencadeados pelo ofidismo (KOH *et al.*, 2006). A fração não proteica da peçonha é constituída por compostos orgânicos de pequena massa molecular (carboidratos, lipídios e aminoácidos livres) e compostos inorgânicos (como cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco) (BJARNASON, FOX, 1994; MARKLAND, 1998; MATSUI, 2000; RAMOS, SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

A purificação e caracterização de inúmeros componentes presentes em peçonhas de serpentes estão amplamente descritos na literatura. As proteínas isoladas de peçonhas ofídicas apresentam diversas atividades biológicas e são classificadas como proteases (serino e metalo), lectinas do tipo C, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido-oxidases, acetilcolinesterases, nucleotidases, nucleosidases e desintegrinas (MATSUI, 2000; SWENSON, MARKLAND, 2005; CUNHA, MARTINS, 2012; QUEIROZ *et al.*, 2011; OHLER *et al.*, 2010; GOMES *et al.*, 2009). Na peçonha de *B. alternatus*, uma das classes de proteínas mais abundantes é a das metaloproteases, seguida pelas serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido-oxidases, desintegrinas e lectinas do tipo-C (Figura 1) (OHLER *et al.*, 2010). Estas proteínas são promissoras para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos por apresentarem ações fibrinogenolíticas, fibrinolíticas, antineoplásicas, anticoagulantes, antimicrobianas, antifúngicas e antiparasitárias (JAIN, KUMAR, 2012; HODGSON, ISBISTER, 2009; PAL *et al.*, 2002).



**Figura 1.** Composição proteica da peçonha de *Bothrops alternatus*. Serinoproteases (svSPs); fosfolipases (PLA<sub>2</sub>s); metaloproteases (svMPs); L-aminoácido oxidases (LAAOs). Fonte: E.H.V. DIAS, 2015 (Adaptado de OHLER *et al.*, 2010).

## 1.2 Fosfolipases A<sub>2</sub>

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s - E.C. 3.1.1.4) são encontradas em diferentes tipos de organismos e em diferentes fluidos biológicos, como, por exemplo, em secreções pancreáticas e exsudados inflamatórios. Estas enzimas têm sido identificadas e caracterizadas em tecidos de mamíferos, bem como em peçonhas de artrópodes e serpentes (SILVEIRA, 2011).

Na fisiopatologia do envenenamento ofídico, as fosfolipases A<sub>2</sub> são relacionadas à lesão tecidual e mionecrose por um efeito direto nas membranas plasmáticas das células musculares. Várias fosfolipases A<sub>2</sub> de serpentes já são bem conhecidas e auxiliam na compreensão de vias metabólicas relacionadas ao envenenamento (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008; NUNES *et al.*, 2011; MARCUSSI *et al.*, 2013).

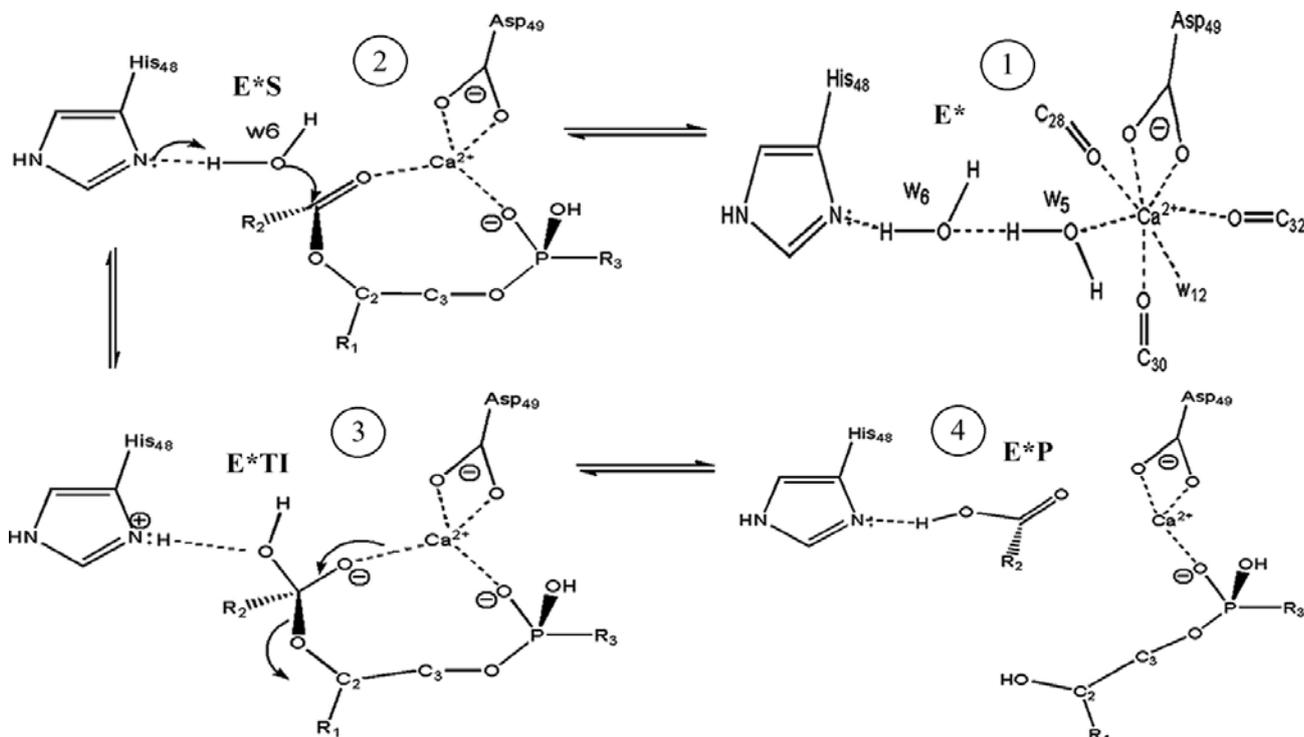
A classificação proposta por Dennis *et al.* (2011) agrupa as PLA<sub>2</sub>s em famílias segundo sua atividade catalítica: as denominadas PLA<sub>2</sub>s secretadas (sPLA<sub>2</sub>), as citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), as independentes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>), as acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), as lipoproteínas associadas a fosfolipases A<sub>2</sub> (LP-PLA<sub>2</sub>) e as fosfolipases A<sub>2</sub> adiposa-específicas (Ad-PLA<sub>2</sub>). Devido à heterogeneidade destas moléculas, o sistema de classificação proposto por Dennis *et al.* (2011) apresenta 16 grupos, nomeados de GI a GXVI, e alguns subgrupos de acordo com suas respectivas características biológicas, estruturais, origem, mecanismo catalítico, massa molecular e sequência de aminoácidos (LOMONTE, GUTIERREZ, 2011; SILVEIRA, 2011).

Em peçonhas de serpentes, as sPLA<sub>2</sub>s são encontradas em elapídeos e viperídeos, designadas como grupo IA e IIAQ, respectivamente. Segundo Dennis *et al.* (2011), as sPLA<sub>2</sub>s são enzimas com massa relativa (Mr) variando entre 13.000 e 18.000 Da, usualmente, contendo de 5 a 8 pontes dissulfeto. Fosfolipases A<sub>2</sub> do grupo IIA, dentro do qual estão as PLA<sub>2</sub>s da família Viperidae, são uma das representantes das sPLA<sub>2</sub>s. Estas sPLA<sub>2</sub>s são divididas em subgrupos como as Asp<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s que apresentam atividade catalítica e as Lys<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s, Arg<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s e Ser<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s, consideradas PLA<sub>2</sub>s similares, com baixa ou nenhuma atividade enzimática (GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1997; OWNBY *et al.*, 1999; SOARES *et al.*, 2004a).

As PLA<sub>2</sub>s catalíticas possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49, sendo este de grande importância para a coordenação do íon Ca<sup>+2</sup>; juntamente com outros aminoácidos, este auxilia na fixação do substrato ao sítio enzimático. Duas regiões são essenciais para o mecanismo de catálise dessas fosfolipases A<sub>2</sub>, a rede catalítica, formada pelos resíduos His<sup>48</sup>, Asp<sup>49</sup>, Tyr<sup>52</sup>, Tyr<sup>73</sup> e Asp<sup>99</sup>, e o *loop* de coordenação do cálcio, Tyr<sup>28</sup>, Gly<sup>30</sup>, Gly<sup>32</sup> e Asp<sup>49</sup> (SCOTT *et al.*, 1990a, ARNI, WARD, 1996).

As sPLA<sub>2</sub>s catalisam a hidrólise da ligação acil-éster na posição sn-2 dos fosfolipídios, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos, como o ácido aracdônico (Figura 2). A hidrólise dos

fosfolipídios está relacionada a importantes atividades fisiológicas e farmacológicas, tais como efeito sobre plaquetas, neurotoxicidade, atividade anticoagulante e mitotoxicidade (OHNO *et al.*, 2003; GUTIÉRREZ, OWNBY, 2003; SANTOS-FILHO *et al.*, 2008; DE PAULA *et al.*, 2009).



**Figura 2.** Mecanismo de ação das PLA<sub>2</sub>s secretadas. Interação do íon cálcio com o Asp<sup>49</sup> do sítio catalítico de sPLA<sub>2</sub>s e substrato. E\* a superfície de interface da proteína livre que está interagindo com a membrana biológica, E\*S enzima com o substrato, E\*TI forma intermediária, E\*P é a enzima e o produto da catálise. Fonte: Adaptado de Bahnson (2005).

Os resíduos que compõem a rede catalítica são de grande importância para manutenção da posição das cadeias laterais dos aminoácidos His<sup>48</sup> e Asp<sup>49</sup>, as quais estão interagindo com uma molécula de água e o cofator cálcio (coordenado pelos oxigênios das cadeias principais dos aminoácidos Try<sup>28</sup>, Gly<sup>30</sup>, Gly<sup>32</sup>, pelos dois oxigênios da cadeia lateral da Asp<sup>49</sup> e por duas moléculas de água), respectivamente (Passo 1). Na complexação com fosfolipídeo, a His<sup>48</sup> extrai o próton de uma molécula de água que inicia o ataque nucleofílico na ligação éster *sn*-2 de fosfolipídios após formar um oxianion tetraédrico intermediário (Passo 2) (SCOTT *et al.*, 1990a). Após a hidrólise da ligação éster *sn*-2 do fosfolipídeo (Passo 3) desempenhada pela PLA<sub>2</sub>, ocorre a liberação de uma molécula de lisofosfolipídeo e uma molécula de ácido graxo (Passo 4) (SCOTT *et al.*, 1990a; BORGES, 2012).

Diferentemente das PLA<sub>2</sub>s cataliticamente ativas, as PLA<sub>2</sub>s homólogas (ou PLA<sub>2</sub>s-símiles) apresentam mutações típicas do resíduo de ácido aspártico na posição 49 para lisinas ou serinas ou argininas, sendo denominadas como Lys<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s ou Ser<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s ou Arg<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s, respectivamente. Em peçonhas de serpentes, é possível encontrar diversas Lys<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub>s, que são

desprovidas de atividade catalítica devido à sua incapacidade de se ligar ao íon  $\text{Ca}^+$ , um co-fator chave para a atividade de  $\text{PLA}_2$ . A ligação ao co-fator  $\text{Ca}^+$  é impedida por diferentes fatores estruturais, como, por exemplo, a mutação do resíduo  $\text{Asp}^{49} \rightarrow \text{Lys}$ , em que a cadeia lateral do resíduo  $\text{Lys}^{49}$  ocupa a posição na qual ocorreria a ligação do íon cálcio, bem como a mutação do resíduo  $\text{Tyr}^{28} \rightarrow \text{Asn}$ , a qual reduz a distância entre os átomos responsáveis para a interação do íon (HOLLAND *et al.*, 1990; FERNANDES *et al.*, 2010).

Considerando as alterações fisiológicas ocasionadas pelas fosfolipases  $\text{A}_2$ , ver-se a necessidade de estudar e compreender os mecanismos de ação destas enzimas, bem como avaliar suas ações biológicas. A busca por moléculas que neutralizem os efeitos tóxicos da peçonha, e que possam ser utilizados previamente à ida ao hospital, aumentando o prazo para o tratamento com o antiveneno, é de grande importância. Este estudo objetivou isolar, caracterizar e avaliar as funções biológicas de uma  $\text{PLA}_2$  (BaltAc- $\text{PLA}_2$ ) da peçonha bruta da serpente *Bothrops alternatus*.

## 2. OBJETIVOS

### OBJETIVOS GERAIS

Descrever a caracterização bioquímica da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e a purificação, a caracterização bioquímica, biofísica e biológica da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, uma fosfolipase A<sub>2</sub> de caráter ácido presente na peçonha de *Bothrops alternatus*.

### OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Isolar uma PLA<sub>2</sub> presente na peçonha de *B. alternatus*, utilizando técnicas cromatográficas de troca iônica e fase reversa;
- Caracterizar físico-quimicamente a BaltAc-PLA<sub>2</sub> por eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrometria de massas;
- Caracterizar biofísicamente por Dicroísmo Circular (CD), Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS) e cristalização a BaltAc-PLA<sub>2</sub>;
- Avaliar a ação catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> e avaliar a inibição dessa atividade na presença de varespladib, suramina e ácido rosmarínico;
- Determinar *in vitro* o potencial oxidante e coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre hemoglobinas e plasma humano, respectivamente.
- Determinar *in vitro* o potencial oxidante da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas;

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1. Obtenção das amostras e aspectos éticos**

Um *pool* da peçonha bruta de *B. alternatus* foi coletado, liofilizado e cedido pelo Biotério da Universidade Católica Dom Bosco (UCDB), Campo Grande, Mato Grosso do Sul, Brasil, conforme “Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UCDB” (ANEXO 1) e “Termos de Procedência de Peçonhas Ofídicas” (ANEXO 02).

O sangue foi obtido por doadores voluntários sadios numa faixa de 18 a 50 anos, tendo como critério de inclusão: jejum de, no mínimo, 4 horas, e não utilização de álcool e outras drogas de forma contínua, como também de medicamentos nos últimos dez dias. O sangue foi coletado em tubos de ensaio a vácuo contendo 3,2% (0,109M) de citrato de sódio (1:9). O citrato de sódio age como um quelante, ligando-se aos íons de cálcio e interrompendo a cascata de coagulação (AMORIN *et al.*, 2010).

Todos os experimentos de atividade enzimática e biológica (com utilização do sangue total ou componentes deste) foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Médicas – CEP/CCM/UFPB, sob o número CAAE: 39037620.1.0000.8069 (ANEXO 03), de acordo com as normas éticas estabelecidas pela Norma Operacional nº 001/2013 - Diretrizes Regulamentadoras da Pesquisa Envolvendo Seres Humanos e da Resolução 466/12 - A Comissão Nacional de Ética em Pesquisa - CONEP do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde.

#### **3.2. Caracterização Físico-Química**

Os experimentos de isolamento e caracterização físico-química da BaltAc-PLA<sub>2</sub> por Cromatografia Líquida de Troca Iônica, Fase Reversa e SDS-PAGE, respectivamente, foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LBME), no Departamento de Biofísica e Farmacologia do Instituto de Biociências da Universidade Estadual Paulista – UNESP, Botucatu, SP. Os experimentos de Espectrometria de Massas foram realizados no Centro de Venenos e Animais Peçonhentos (CEVAP) e no Instituto de Biotecnologia (IBTEC); ambos da UNESP, Botucatu, SP.

##### **3.2.1. Purificação**

Foram realizados dois processos cromatográficos para isolar a PLA<sub>2</sub> da peçonha bruta de *B. alternatus*, cromatografia líquida de troca iônica e cromatografia líquida de fase reversa, respectivamente.

O primeiro fracionamento foi realizado por cromatografia líquida de troca iônica, no equipamento HPLC (High Performance Liquid Chromatography - *AKTA Purifier*, *GE Healthcare*), utilizando uma coluna DEAE Sepharose FF (5 ml) previamente equilibrada com Tris HCl 20 mM (pH 8,0). Foram utilizados 50 mg da peçonha bruta liofilizada de *B. alternatus* solubilizado em 5 mL de Tris HCl 20 mM (pH 8,0) e centrifugada a 10.000 rpm por 5 minutos, para a remoção de porções não solúveis. Foi aplicado um gradiente crescente de 0 a 100% de Tris HCl (20mM; pH 8,0) + NaCl (1M) (tampão de eluição) com fluxo constante de 3,0 mL/min. As frações foram detectadas por luz ultravioleta (UV), com absorbâncias máximas no comprimento de onda em 280 nm, e coletadas manualmente em tubos com volume de 15 mL. As frações correspondentes à PLA<sub>2</sub> foram agrupadas e liofilizadas.

Um segundo passo de isolamento foi realizado utilizando o equipamento UFLC (Ultra Flow Liquid Chromatography – LC-6AD, Shimadzu Corporation) e a coluna C18 (Shimadzu Shim-Pack CLC-ODS-M, 25 cm x 4,6 mm). As frações liofilizadas foram ressuspensas em 0,1% de Ácido Trifluoroacético (TFA) e submetidas a uma cromatografia líquida de fase reversa. A coluna foi previamente equilibrada com 0,1% de TFA e a eluição foi realizada em gradiente crescente (0 – 100%) com fluxo constante de 1,0 mL/min do tampão de eluição (66,5% de Acetonitrila diluído em 0,1% de TFA). Foram empregados os seguintes parâmetros: 0% de tampão de eluição por cinco minutos, seguidos de 0% a 100% de tampão de eluição durante 65 minutos e 100% do tampão de eluição por 5 minutos. As frações foram coletadas de forma automatizada utilizando um coletor de frações refrigerado à temperatura constante de 4 °C, ligado a um detector de luz ultravioleta (UV) com absorbância máxima no comprimento de onda em 280 nm.

A fração correspondente à PLA<sub>2</sub> foi determinada pela análise das bandas proteicas com massa molecular de, aproximadamente, 14 kDa no SDS-PAGE. Em seguida, essas frações foram liofilizadas e armazenadas em temperatura constante de – 20°C.

### **3.2.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE)**

Com o objetivo de obter informações sobre a massa molecular da proteína isolada e o grau de pureza da amostra obtida, foram utilizados experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE). Os experimentos de SDS-PAGE foram realizados com gel de separação contendo 12% de Bis-Acrilamida em um sistema desnaturante e reduzido conforme adaptações da técnica descrita por Laemmli (1970).

Para preparação das amostras, 10 µl do tampão SDS (contendo Tris-HCl 0,5M pH 6,8; SDS 10%; glicerol 100%; β-mercaptoetanol; H<sub>2</sub>O ultrapura e azul de bromofenol) foram adicionados aos 20 µl de amostra (frações obtidas nos experimentos de cromatografia) e aquecidas por cinco minutos a 100 °C. Posteriormente, as amostras foram rapidamente centrifugadas e 15 µl de cada amostra foram aplicados no gel.

Para preparar um gel de separação a 12 % de Bis-Acrilamida, foram utilizadas as soluções: 30% de Bis-Acrilamida, 1,5 M de Tris-HCl (pH 8,8), 10% de SDS, N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamino (TEMED) e 10% de Persulfato de Amônio (PA). O gel de empilhamento, a 4% de Bis-Acrilamida, foi preparado com Bis-Acrilamida a 30%, 0,5 M de Tris-HCl (pH 6,8), 10% de SDS, TEMED e 10% de PA. A separação das frações foi realizada sob corrente elétrica constante de 30 mA, em temperatura ambiente, utilizando o Tampão de Corrida Tris-Glicina (Tris-base; Glicina; SDS 10%).

O marcador molecular PageRuler Plus<sup>TM</sup> (Thermo Scientific<sup>TM</sup>) foi utilizado como padrão de massa molecular para comparar com as bandas proteicas das amostras advindas dos processos de cromatografia. Os géis foram corados com solução corante contendo H<sub>2</sub>O ultrapura; etanol 100%; ácido acético; coomassie blue R250 (Bio-Rad) e descorados em solução descorante na proporção de 6:3:1 de água deionizada; etanol; e ácido acético, respectivamente.

### **3.2.3. Espectrometria de Massas**

A Espectrometria de Massas (MS) é uma técnica analítica na qual as moléculas de uma amostra são convertidas em íons em fase gasosa e, então, separados no espectrômetro de massas de acordo com sua razão massa (m) sobre a carga (z), m/z.

A BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi quantificada pelo método de Bradford (1976), utilizando o kit BioRad<sup>®</sup> ProteinAssay, tendo como proteína padrão a albumina bovina (BSA). Primeiramente, 50 µg da proteína liofilizada foram solubilizadas em 60 µl de bicarbonato de amônio 50 mM. Foram adicionados 25 µl do surfactante Padrão RapiGest SF e foram incubados a 37°C por 60 minutos. Em seguida, a amostra foi submetida às etapas de redução e alquilação, utilizando DTT 10 mM e iodoacetamida 45 mM, respectivamente. A digestão enzimática em solução foi realizada com a enzima tripsina na concentração 1:100 (enzima:amostra) solubilizada em tampão bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7.8. A hidrólise ocorreu durante 18 horas e foi interrompida com a adição de 10 µl de ácido fórmico a 5% (v/v). A amostra foi incubada por 90 minutos à temperatura ambiente e centrifugada a 14.000 rpm a 6°C, por 30 minutos. O sobrenadante, contendo os digestos tripticos, foi transferido para um tubo novo. Os digestos tripticos contidos em cada amostra foram

submetidos às colunas de dessalinização Peptide Clean-up C18 Spin (Agilent Technologies) segundo as recomendações do fabricante.

As análises de espectrometria de massas foram realizadas utilizando o equipamento de nanocromatografia líquida Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany) acoplado a um equipamento de espectrometria de massas Q-Exactive (ThermoFisher Scientific, Bremen, Germany). As fases móveis utilizadas foram: tampão de equilíbrio - 0,1% (v/v) de ácido fórmico em água LCMS e tampão de eluição - 0,1% (v/v) de ácido fórmico em 80% (v/v) de acetonitrila. Os peptídeos foram colocados em uma pré-coluna C18, 30  $\mu\text{m}$  x 5 mm (ThermoFisher Scientific) e dessalinizados num gradiente isocrático de 4% do tampão de eluição por 3 minutos, fluxo de 300 nL/min. Em seguida, os peptídeos foram fracionados por uma coluna analítica Reprisil-Pur C18-AQ, 3  $\mu\text{m}$ , 120  $\text{\AA}$ , 105 mm (PICOCHIP), utilizando gradiente linear de 4-55% do tampão de eluição por 30 min, 55-90% do tampão de eluição por 1 min, 90% do tampão de eluição por 5 minutos e reequilibrado por 4% do tampão de eluição por 20 minutos, fluxo de 300 nL/min. A ionização foi realizada em uma fonte *Nano spray ion source* (PICOCHIP); o modo de operação foi ionização positiva utilizando o método DDA. A câmara de fragmentação foi condicionada com energia de colisão entre 29 a 35 %, com resolução de 17.500, 50 ms de tempo de injeção, 4,0 m/z de janela de isolamento e exclusão dinâmica de 10s. Os dados de espectrometria foram obtidos no software Thermo X calibur (versão 4.0.27.19, ThermoFisher Scientific Inc.).

Os dados brutos no formato \*.RAW foram processados no *software* PatternLab (versão 4.0.0.84 [Carvalho et al, 2016]) para a obtenção da identificação da proteína. Os principais parâmetros utilizados neste *software* foram: banco de dados NCBI (taxonomia *Bothrops*); enzima tripsina; permissão de duas clivagens perdidas; modificação pós-traducional, carbamidometilação dos resíduos de cisteínas; modificação pós-traducional variável, oxidação dos resíduos de metionina; erros de tolerância MS 40 ppm e MS/MS de 0,0200 ppm. A taxa de FDR (*False Discovery*) máxima foi considerada de  $\leq 1\%$ .

### 3.3. Caracterização Biofísica

Os experimentos de caracterização biofísica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram realizados no Laboratório de Biologia Molecular Estrutural (LBME) da UNESP, Botucatu, SP.

#### 3.3.1. Espectroscopia de Dicroísmo Circular (CD)

A integridade da estrutura secundária da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi avaliada pela técnica espectroscópica de dicroísmo circular (240-180 nm) utilizando o espectropolarímetro JASCO J-815 (JASCO Spectroscopic Co., Ltd., Japão) acoplado com um termocontrolador do tipo Peltier.

A BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi ressuspensa em 0,5 mg/mL de Bicarbonato de Amônio (pH 8,0) e filtrada em filtro 0,22 µm para a remoção de partículas que poderiam causar o espalhamento indesejado de luz.

Os experimentos foram realizados sob fluxo de nitrogênio gasoso, utilizando uma cubeta de quartzo de 0,5 nm, *scanning speed* de 100 nm/minuto, tempo de resposta de 1s, *bandwich* de 2 nm e temperatura de 20°C. O sinal do tampão no qual a amostra estava diluída (Bicarbonato de Amônio) foi subtraído de cada amostra.

### 3.3.2. Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Experimentos de espalhamento de luz dinâmico fornecem informações sobre o tamanho e monodispersividade de macromoléculas em solução através da determinação do raio hidrodinâmico, do coeficiente de difusão translacional, da porcentagem de polidispersão e da massa molecular estimada (BURLEY, 1997).

A homogeneidade da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi avaliada por DLS. Os dados foram coletados em temperatura constante de 18 °C utilizando o equipamento DynaPro® Titan (Wyatt Technology). A proteína foi solubilizada em 50 mM de formato de amônio (pH 3,5) na concentração de 3 mg/mL, filtrada e, em seguida, injetada cuidadosamente dentro de uma cubeta de quartzo evitando a formação de bolhas de ar. A amostra foi medida 100 vezes e os dados foram adquiridos e analisados pelo *software* Dynamics v.6.10.

### 3.3.3. Cristalização da proteína

Os experimentos de cristalização da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram realizados adotando o *método da matriz esparsa*, onde três parâmetros principais, que podem afetar o processo de cristalização, são considerados: pHs (tampões), aditivos (sais e/ou agentes orgânicos) e adição de polímeros (polietileno glicol – PEG e 2-metil-2,4-pentanediol – MPD) (JANCARIK *et al.*, 1991).

Para obtenção dos cristais de BaltAc-PLA<sub>2</sub>, foi utilizada a técnica de difusão de vapor no sistema *sitting drop* (“gota sentada”). Testes iniciais foram realizados utilizando kits comerciais para cristalização (*Molecular Dimensions – JCSG-Plus<sup>TM</sup>*) com gotas montadas de forma automatizada utilizando o *Oryx4 (Douglas Instruments)*. As gotas foram compostas por 0,3 µl da proteína, solubilizada em 50 mM de formato de amônio (pH 3,5) (concentração de 12 mg/ml), e 0,3 µl de solução precipitante. As soluções dos poços continham 40 µl de solução precipitante. São duas soluções em um sistema fechado, uma formada pelo agente precipitante em alta concentração e outra formada pelo mesmo agente precipitante mais a proteína. Devido à diferença de concentração entre estas soluções, uma tende a ganhar vapor de água (agente precipitante em

alta concentração) e a outra tende a perder vapor de água (agente precipitante + proteína). Logo, ao perder vapor de água, as moléculas de proteína podem iniciar um processo de cristalização (nucleação) ordenado e formar um monocristal (desejável e necessário para a coleta de difração de raios X) (MCPHERSON, 1989; DUCRUIX, GIEGÉ, 1992).

### **3.4. Atividade Enzimática e Biológica**

Os experimentos para avaliar as atividades catalítica, oxidante e coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram realizados no Laboratório de Cristalografia de Proteínas (CPr-Lab), do Departamento de Biologia Molecular, DBM-CCEN e no Laboratório Multiusuário do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba, UFPB, João Pessoa, PB.

#### **3.4.1. Atividade Catalítica**

Foram realizados dois experimentos para avaliar a ação catalítica de BaltAc-PLA<sub>2</sub>, sendo o primeiro utilizando o *kit sPLA<sub>2</sub> Assay*, tendo como substrato o Diheptanoil Tio-PC, e o segundo de forma indireta, utilizando eritrócitos e gema de ovo.

A avaliação da atividade de PLA<sub>2</sub> direta foi realizada utilizando-se o *kit sPLA<sub>2</sub> Assay*. Foram utilizadas quatro amostras diferentes: *i.* controle positivo (PLA<sub>2</sub> isolada do veneno de abelha – Bee-PLA<sub>2</sub> – 10 µg/ml); *ii.* peçonha bruta de *B. alternatus* (50 µg/ml); *iii.* BaltAc-PLA<sub>2</sub> na concentração de 10 µg/ml; *iv.* BaltAc-PLA<sub>2</sub> na concentração de 20 µg/ml. As fosfolipases A<sub>2</sub>, que apresentam ação catalítica, quebram o substrato Diheptanoil Tio-PC na porção *sn-2*, gerando dois produtos, os quais, pela adição de DTNB na reação, leva a formação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico e ácido graxo. A atividade catalítica foi monitorada pela absorvância do produto da catálise, ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, que pode ser medido a 414 nm. Foram realizadas oito medidas espectrofotométricas utilizando o NanoDrop 2000c (Thermo Scientific) em intervalos de 1 minuto.

A avaliação da atividade fosfolipásica de forma indireta da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi determinada a partir de adaptações do método de Haas *et al.* (1968), utilizando como fonte de lecitina uma emulsão de gema de ovo de galinha. Uma diluição da gema de ovo a 10% foi preparada separando a gema da clara. A gema foi lavada com Tampão Fosfato Salina (do inglês, PBS 10x, pH 7,4), filtrada, homogeneizada em PBS na proporção de 2:8 e centrifugada a 2.000 G por um minuto. O sobrenadante obtido após a centrifugação foi congelado até o momento do uso. Uma solução de 3% de hemácias em 150 mM de NaCl foi utilizada no experimento. Para obtenção das hemácias, o

sangue venoso total foi coletado em tubo citratado, centrifugado e as hemácias foram lavadas três vezes com 150 mM de NaCl (1:2) por centrifugação a 3.000 rpm por 5 minutos em temperatura ambiente. Foi preparado 18,25 mL de um substrato para avaliação da ação catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> contendo 3 mL de hemácias a 3%, 100 µl de gema de ovo a 10%, 150 µl de CaCl<sub>2</sub> e 15 mL de agarose (180 mg diluída em PBS). O substrato foi distribuído em placas de Petri para completa solidificação e, em seguida, foram feitos pequenos orifícios de 0,3 cm de diâmetro nos quais foram colocados 15 µl das amostras desejadas. Ao total, quatro placas foram preparadas, sendo uma para avaliar a ação catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (0,5 mg/ml) e três para avaliar o potencial de inibição da ação catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> por três inibidores candidatos, varespladib, suramina e ácido rosmarínico, na proporção de 10:1 (dez moléculas dos compostos para uma de proteína). A ação catalítica e o potencial de inibição foram avaliados pela observação do diâmetro do halo de catálise formado.

### 3.4.2. Atividade oxidante

A avaliação da atividade oxidante, tanto da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*, como da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre hemoglobinas humanas (SolHb), foi realizada *in vitro*. Para a avaliação do efeito oxidante, duas SolHb foram utilizadas: *i*. SolHb-ST proveniente do sangue total (contendo 10% de sangue total, glicose a 10% e PBS) e *ii*. SolHb-CE proveniente de um concentrado de eritrócitos (concentrado de eritrócitos a 5%, lavados três vezes com PBS, a 3.000 rpm durante 5 minutos, glicose a 10% e PBS). Utilizou-se triton X-100 para a lise das hemácias das duas soluções, expondo a hemoglobina.

Após o preparo das SolHb, diferentes quantidades da peçonha bruta ou da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram adicionadas separadamente em cada SolHb em uma placa de 96 poços e incubadas por 20 minutos em temperatura ambiente. Os controles negativos foram compostos somente por SolHbs, enquanto que os controles positivos continham SolHbs e fenilhidrazina, um reconhecido agente com ação oxidante. Para obtenção da taxa de oxidação das hemoglobinas, foram realizadas leituras nos comprimentos de ondas de 540 e 630 nm em um leitor de microplacas (Multiskan GO), a cada hora, por 72 horas de experimentação. O cálculo da taxa de metahemoglobina (mHb) formada foi realizado de acordo com a equação #1.

$$\%metHb = 100x \frac{D.O.(630nm)}{D.O.(630nm) + D.O.(540nm)} \quad \text{Equação \#1}$$

Foram utilizadas cinco diferentes quantidades (1,0; 5,0; 10; 50 e 100 µg) da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e três diferentes quantidades (1,0; 5,0 e 10 µg) da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, solubilizados em PBS 10x, pH 7,4. Todos os experimentos foram realizados em triplicata.

Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente utilizando o teste Two-way ANOVA no software GraphPad Prism versão 8.0 (GraphPad Software Inc., San Diego CA, E.U.A). Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significantes (ns: valor de  $p > 0,05$ ; \*: valor de  $p < 0,01$ ; \*\*: valor de  $p < 0,001$ ; \*\*\*: valor de  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*: valor de  $p < 0,00001$ ).

### 3.4.3. Atividade coagulante

Para a avaliação da atividade coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, amostras de sangue foram centrifugadas a 3.000 rpm por 15 minutos; o plasma foi separado em tubos do tipo falcon de 15mL e imediatamente utilizados. Foram realizados testes de triagem TP (Tempo de Protrombina) e TTPa (Tempo de Tromboplastina) para seleção dos plasmas que constituiriam o pool, de acordo com os valores de referências determinados no laboratório (TP de 11 a 15 segundos; TTPa de 24 a 39 segundos). Os plasmas que não estavam dentro dos valores de referência para TP e TTPa foram descartados.

A avaliação da atividade coagulante de BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi realizada de forma automatizada com a utilização do equipamento Coagmaster 2.0 (Wama Diagnóstica), nas quantidades 11,2; 22,4; 33,6; 44,8 e 89,6  $\mu$ g, solubilizadas em PBS (10x, pH 7,4) sobre o plasma humano citratado.

Para realização do experimento, 100  $\mu$ l de um *pool* de plasma humano citratado mantido a 37° C foi transferido para cubeta. As diferentes quantidades de BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram adicionadas separadamente e, imediatamente, foi aferido o tempo de obtenção do coágulo. TP e TTPa foram utilizados como controle para a coagulação, comparando o tempo de formação do coágulo destes em relação à BaltAc-PLA<sub>2</sub>. Todos os experimentos para avaliar a atividade coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram realizados em triplicata.

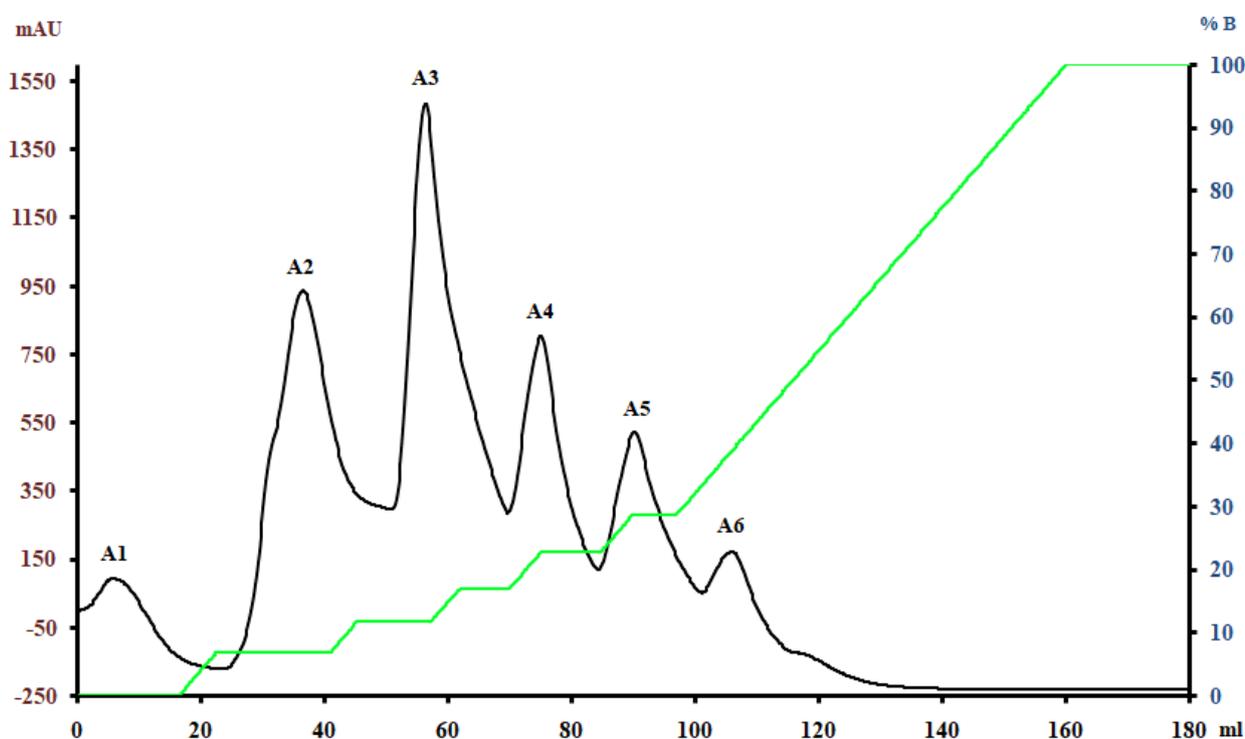
Os resultados foram expressos como média  $\pm$  erro padrão da média (EPM) e analisados estatisticamente utilizando o teste One-way ANOVA e o teste de comparações múltiplas de Dunnet. Os resultados foram considerados não significativos (ns) a 5% ou maior probabilidade de erro. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos (\*: valor de  $p < 0,01$ ; \*\*: valor de  $p < 0,001$ ; \*\*\*: valor de  $p < 0,0001$  e \*\*\*\*: valor de  $p < 0,00001$ ). Todos os resultados foram avaliados com o software GraphPad Prism, versão 6.0 (GraphPad Software Inc., San Diego, CA, EUA).

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Caracterização Bioquímica

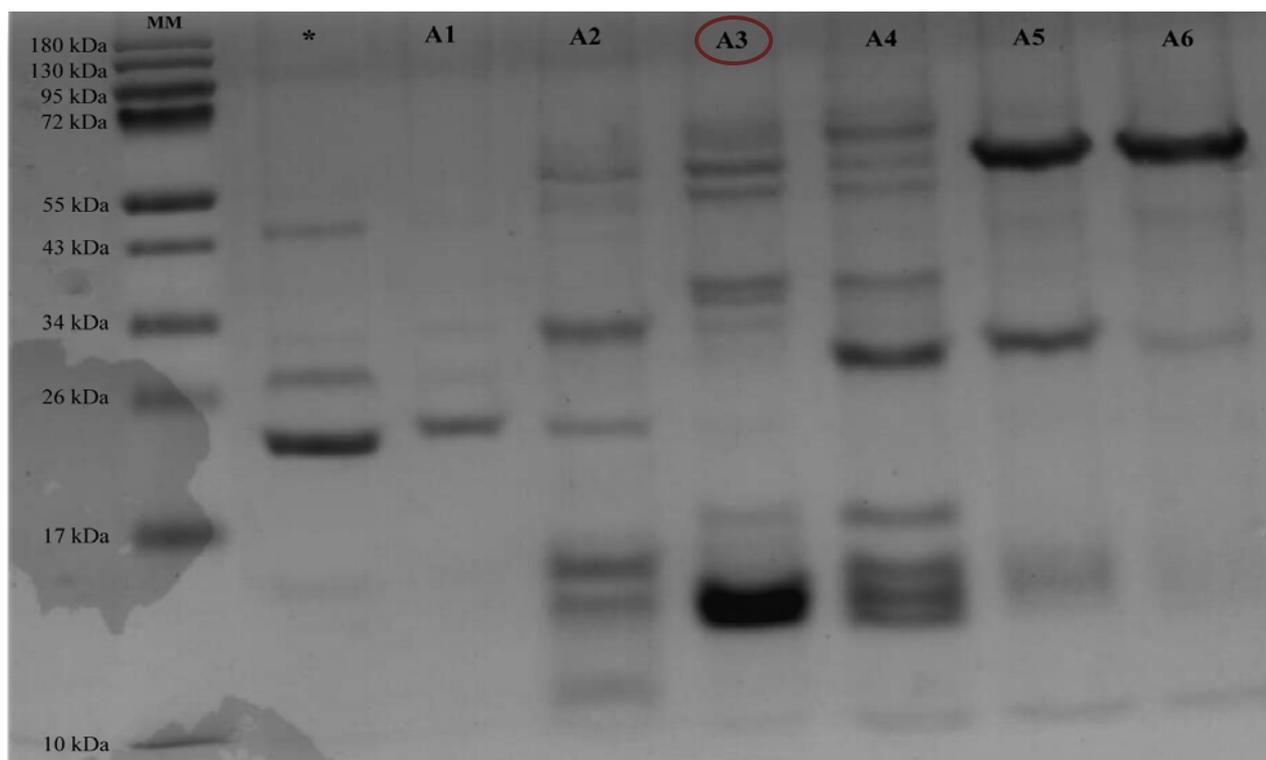
#### 4.1.1 Purificação e SDS-PAGE

A PLA<sub>2</sub> foi obtida utilizando dois passos de purificação. Primeiramente, a peçonha bruta de *B. alternatus* (50 mg) foi submetida à cromatografia de troca iônica (DEAE Sepharose) e resultou em 6 frações principais, as quais foram nomeadas de A1 a A6 (Figura 3).



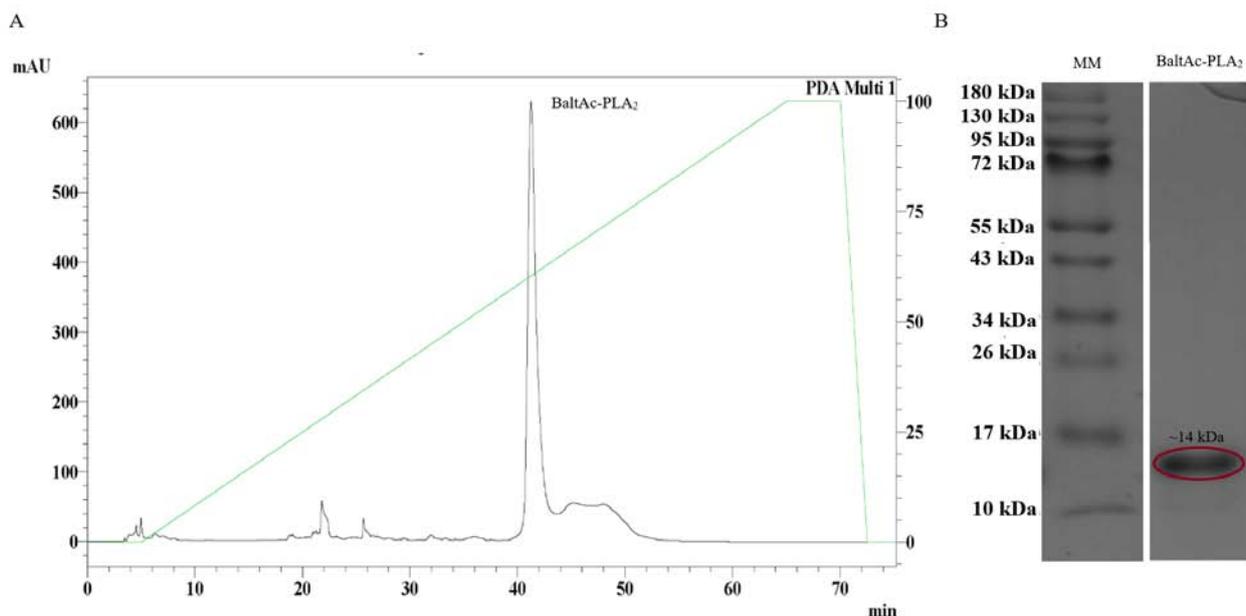
**Figura 3.** Cromatograma da cromatografia líquida de troca iônica (DEAE Sepharose) em um gradiente crescente de 0 a 100% de 20 mM de Tris HCl (pH 8,0) + NaCl (1M), resultando em seis frações principais, nomeadas de A1 a A6.

As frações A1, A2, A3, A4, A5 e A6 foram obtidas a 0, 6,9, 11,7, 17, 22,7 e 28,6 %, respectivamente, do tampão 20 mM de Tris HCl, pH 8,0 + 1M NaCl. Todas as frações foram coletadas e submetidas a experimentos de SDS-PAGE a 12%, para identificar qual fração continha a PLA<sub>2</sub>. A fração A3, obtida em 11,7 % do tampão de eluição, foi a que apresentou uma maior concentração de PLA<sub>2</sub> (Figura 4).



**Figura 4.** Eletroforese em Gel de Poliacrilamida contendo Dodecil Sulfato de Sódio (SDS-PAGE a 12%). Frações obtidas na cromatografia líquida de troca iônica (A1 - A6). A3: Fração com maior quantidade de fosfolipase A<sub>2</sub>. MM: Massa Molecular (PageRuler Plus™, Thermo Scientific™). \**flowthrough*.

A fração A3 obtida na cromatografia de troca iônica foi liofilizada e submetida a uma cromatografia líquida de fase reversa. A fração A3 foi ressuspensa em 0,1% de TFA e submetida a essa nova etapa de purificação utilizando um gradiente crescente de 0 a 100% de 66,5% de Acetonitrila diluída em 0,1% de TFA. A fração correspondente à PLA<sub>2</sub> foi coletada aos 60% do tampão de eluição, sendo nomeada de BaltAc-PLA<sub>2</sub> (Figura 5 - A). Esta foi posteriormente submetida a experimentos de SDS-PAGE 12%, apresentando uma única banda e massa molecular de, aproximadamente, 14 kDa (Figura 5 - B).



**Figura 5.** Cromatografia líquida de fase reversa. (A) Cromatograma com gradiente crescente de 0 a 100% do tampão de eluição (66,5% de Acetonitrila diluída em 0,1% de TFA). (B) SDS-PAGE a 12%, única fração observada apresentou massa molecular de ~ 14 kDa, correspondente a uma PLA<sub>2</sub>, a qual foi denominada BaltAc-PLA<sub>2</sub>. MM: Massa Molecular (PageRuler Plus™, Thermo Scientific™).

#### 4.1.2 Espectrometria de massas

As análises dos dados de espectrometria de massas, quando comparados com as sequências de fosfolipases A<sub>2</sub> do gênero *Bothrops*, depositadas no banco de dados do *Universal Protein Resource* (UniProt), resultaram em dezoito (18) tipos de fosfolipases A<sub>2</sub> identificadas (Tabela 1). Dentre estas identificações, pode-se notar a presença de uma única fosfolipase A<sub>2</sub> ácida da serpente *Bothrops alternatus*, massa molecular 13.715,1 kDa sob código de acesso P86456, que foi compatível com os dados experimentais da toxina BaltAc-PLA<sub>2</sub> (Tabela 1 – em destaque).

**Tabela 1.** Fosfolipases A<sub>2</sub> identificadas no *Universal Protein Resource*, que compartilham da sequência experimental da BaltAc-PLA<sub>2</sub>.

Locus (cód.UNIPROT)	Aminoácidos	Massa Molecular	Cobertura	Descrição
G3DT18	138	15651	0,2681	BmooPLA <sub>2</sub> PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops moojeni</i>
Q2HZ28	138	15406,9	0,6232	BE-I-PLA <sub>2</sub> PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops erythromelas</i>
Q8AXY1	138	15427	0,2681	BthA-1 PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops jararacussu</i>
D0UGJ0	139	15366,2	0,4388	BpPLA <sub>2</sub> -TXI PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops pauloensis</i>
P86907	122	13840,1	0,2705	PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops ammodytoides</i>
C9DPL5	122	13609	0,2049	BpirPLA <sub>2</sub> -I PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops pirajai</i>
Q8QG87	138	15729,9	0,1812	BITP01A PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops insularis</i>

<b>Q9I8F8</b>	122	13705	0,1803	PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops pictus</i>
<b>P86974</b>	122	13909,4	0,1475	PLA <sub>2</sub> básica de <i>Bothrops leucurus</i>
<b>P20474</b>	138	15722,6	0,1304	Myotoxin I PLA <sub>2</sub> básica de <i>Bothrops asper</i>
<b>P45881</b>	138	15736,4	0,1304	Bothropstoxin-2 homóloga PLA <sub>2</sub> básica de <i>Bothrops jararacussu</i>
<b>P81243</b>	124	14276,1	0,1452	PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops jararaca</i>
<b>P0DJ62</b>	60	6532,8	0,3	PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops leucurus</i>
<b>P86389</b>	124	14166,1	0,1452	PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops asper</i>
<b>P86456*</b>	121	13715,1	0,0909	SpII RP4 PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops alternatus</i>
<b>C0HJP9</b>	45	5292,3	0,2444	PLA <sub>2</sub> de <i>Bothrops diporus</i>
<b>P0DTS7</b>	121	14116,6	0,0579	BbTX-III PLA <sub>2</sub> básica de <i>Bothrops brazili</i>
<b>P84397</b>	107	12197,2	0,0935	PLA <sub>2</sub> ácida de <i>Bothrops insularis</i>

\* única toxina de *Bothrops alternatus* comparada a BaltAc-PLA<sub>2</sub>

A identificação da fosfolipase A<sub>2</sub> ácida da serpente *Bothrops alternatus* foi obtida pelo sequenciamento peptídico de sete espectros de massas de um único peptídico (CCFVHDCCYGK). Este sequenciamento experimental resultou em 9% de cobertura da toxina P86456 depositada no banco de dados UNIPROT (Figura 6).



**Figura 6.** Alinhamento da sequência parcial de BaltAc-PLA<sub>2</sub> com a sequência de uma fosfolipase ácida de *Bothrops alternatus*.

A toxina isolada foi caracterizada como uma fosfolipase A<sub>2</sub> de caráter ácido, por apresentar homologia com outras fosfolipases A<sub>2</sub> ácidas já descritas na literatura (Figura 7). A baixa cobertura obtida e a elevada similaridade com outras fosfolipases A<sub>2</sub> de caráter ácido do gênero *Bothrops* indicaram que, provavelmente, a existência de proteoformas da fosfolipase A<sub>2</sub> de caráter ácido isoladas da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* foram pouco estudadas até o presente.

	1	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	110	120	124
<i>B. alternatus</i>	P86456	NLVQFKTLIMKIAGRSVYKY	-FYGCYCGHGGIGQPRD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTNCNPK	TATYSY--TEENGALV	CGGDDPCKKQVCECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
<i>B. ammodytoides</i>	P86907	HLMQFETLIMKIAGRSVYKY	-FYGCYCGSGGRGKPKD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTGCDPK	HDFYTY--SEENGVV	CGGDDPCKKQICECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
<i>B. pictus</i>	Q9I8F8	SLVQFETLIMKIAGRSVYKY	-FYGCYCGSGGRGKPKD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTGCDPK	HDFYTY--SEENGVV	CGGDDPCKKQICECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
<i>B. asper</i>	P86389	NLMQFGQMHSDVHRKRVYKY	-FYGCYCGHGGIGQPRD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTGCDPK	HDIYTY--SEENGVV	CGGDDPCKKQICECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
<i>B. jararaca</i>	P81243	DLMQFGQMHSDVHRKRVYKY	-FYGCYCGHGGIGQPRD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTGCDPK	HDIYTY--SEENGVV	CGGDDPCKKQICECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
<i>B. jararaca</i>	C9DPL5	NLMQFGKLIHKIAGSGVYKY	-FYGCYCGHGGIGQPRD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTGCDPK	HDIYTY--SEENGVV	CGGDDPCKKQICECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
<i>B. pirajai</i>	P0D162	SLMQFGKLIHKIAGSGVYKY	-FYGCYCGHGGIGQPRD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTGCDPK	HDIYTY--SEENGVV	CGGDDPCKKQICECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
<i>B. leucurus</i>	P0D162	SLMQFGKLIHKIAGSGVYKY	-FYGCYCGHGGIGQPRD	DRCCFVHDC	CCYGVKVTGCDPK	HDIYTY--SEENGVV	CGGDDPCKKQICECD	RYAHCFRN	KDITYDNKYHFL	PPKNCQE	SEPC			
BaltAc-PLA2														
Consensus		.l.qf...i.....s.v..y..ygcycg.gg.g.p.datdr	CCFVHDC	CCYGVKvtgcdpk										

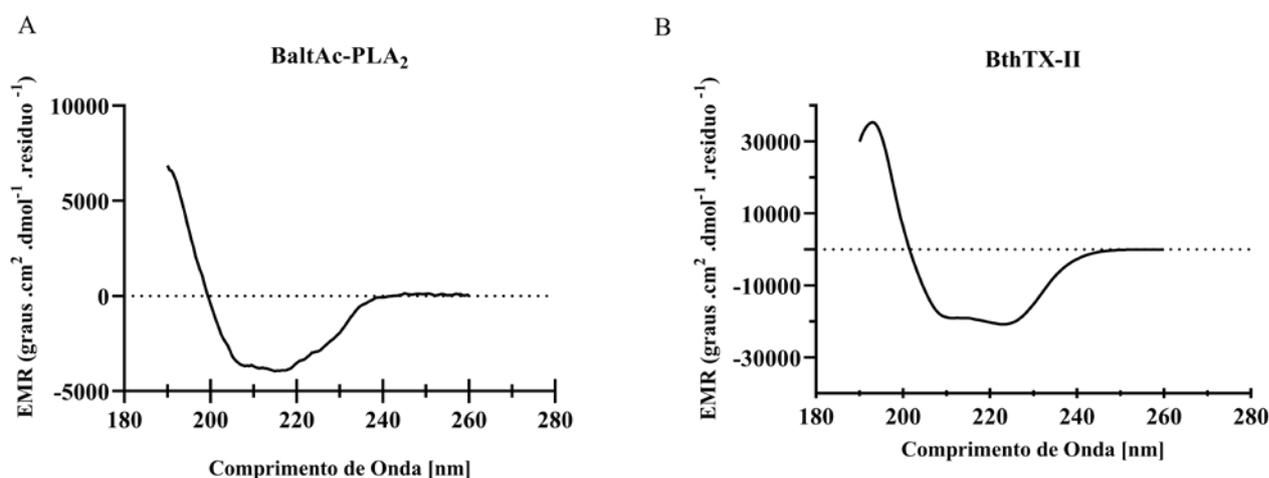
TOXINA ISOLADA NESTE TRABALHO

**Figura 7.** Alinhamento da sequência parcial de aminoácidos da BaltAc-PLA<sub>2</sub> com outras PLA<sub>2</sub>s ácidas ofídicas. Banco de dados utilizado: Swiss-Prot → *Bothrops* → Fosfolipases A<sub>2</sub>.

## 4.2 Caracterização Biofísica

### 4.2.1 Espectroscopia Dicroísmo Circular (CD)

Os resultados de CD obtidos da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (Figura 8A) foram comparados com os resultados obtidos da BthTX-II, uma PLA<sub>2</sub> catalítica com caráter básico isolada da peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* (Figura 8B). A BthTX-II e BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram comparadas por possuírem enovelamento semelhante, ambas apresentam atividade catalítica e foram isoladas de serpentes do gênero *Bothrops*.

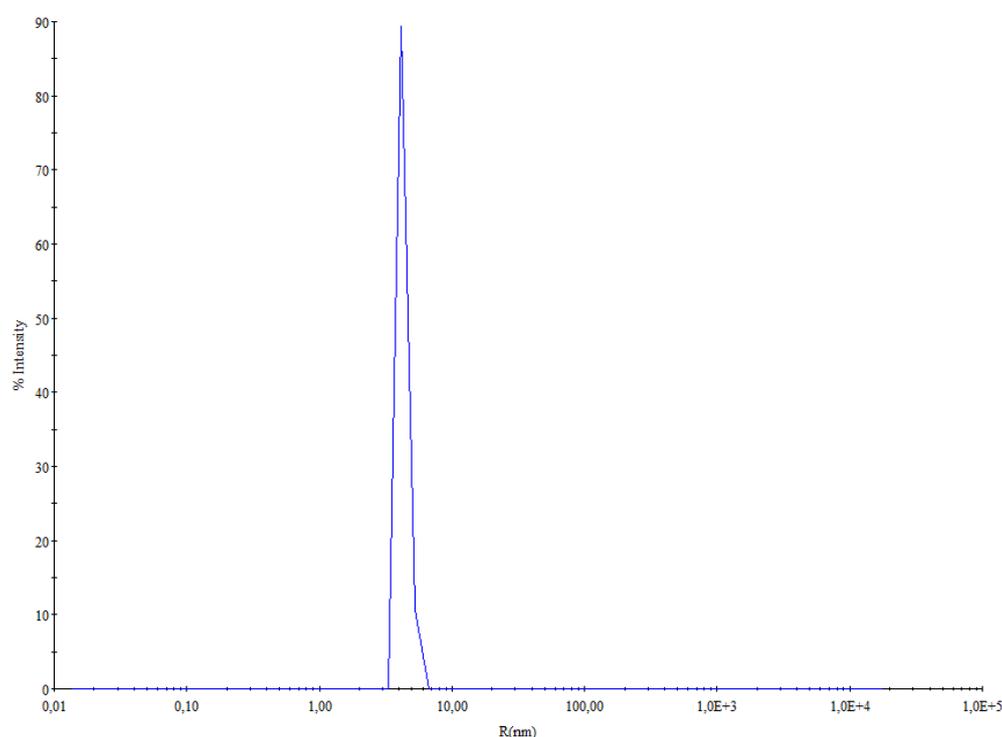


**Figura 8.** Comparação entre os espectros de dicroísmo circular da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (0,5 mg/ml) solubilizada em bicarbonato de amônio (A) e BthTX-II (B).

A BaltAc-PLA<sub>2</sub> apresentou enovelamento com uma predominância de estruturas em hélices- $\alpha$ . O espectro foi obtido por espectroscopia na região espectral “UV distante” (190 – 250 nm), apresentando picos nos comprimentos de onda de 195, 208 e 222 nm, característicos de estruturas alfa helicoidais.

#### 4.2.2 Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS)

Para a realização dos experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS), a BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi solubilizada em 50mM de Formato de Amônio, pH 3,5 e filtrada, obtendo concentração final de 3 mg/ml. Os resultados foram analisados pelo programa Dynamics v.6.10 indicando um único pico com comportamento monomodal, com polidispersidade (Pd) de 8,1% e raio hidrodinâmico (R<sub>H</sub>) de 4,3 nm. Este valor de R<sub>H</sub> corresponde a associações moleculares com massa molecular de aproximadamente 101 kDa e correspondendo a 100% da massa medida. A BaltAc-PLA<sub>2</sub> apresentou conformação oligomérica, composta por sete moléculas desta proteína, indicando sua pureza ao mostrar-se monodispersa (Pd baixa) (Figura 9).



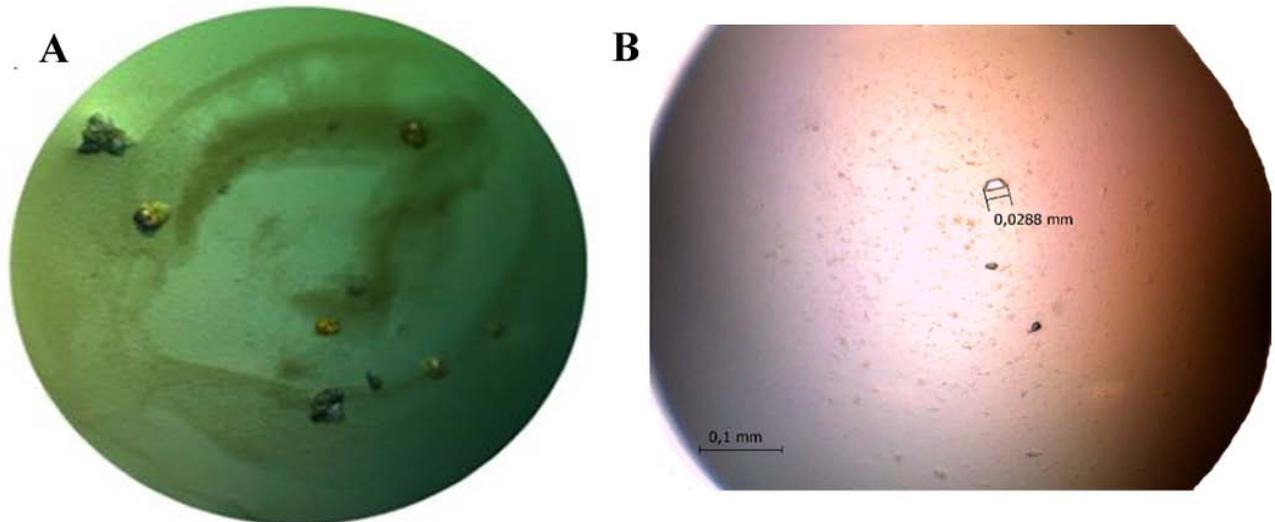
Item	R <sub>H</sub> (nm)	% Pd	Massa Molecular (kDa)	% Intensidade Espalhada	% Massa
Pico 1	4,3	8,1	101	100	100

**Figura 9.** Distribuição monomodal da BaltAc-PLA<sub>2</sub> a 3 mg/mL, solubilizada em formato de amônio, pH 3,5.

#### 4.2.3 Cristalização da Proteína

De todas as 96 condições do *kit Molecular Dimensions – JCSG – Plus<sup>TM</sup>*, três possibilitaram o aparecimento de cristais da BaltAc-PLA<sub>2</sub>. Os cristais formados na condição composta por 0,2 M de Cloreto de magnésio hexahidratado, 0,1 M de Bis-tris, pH 5,5 e 25% de

PEG 3350 eram policristais (Figura 10 – A). Alguns policristais também se formaram na condição de cristalização composta por 0,2 M de Cloreto de sódio, 0,1 M de fosfato/citrato pH 4,2 e 20% PEG 8000. Foram obtidos monocristais na condição contendo 1,0 M de Fosfato di-amônio e 0,1 M de Acetato de sódio, pH 4,5 (Figura 10 – B).

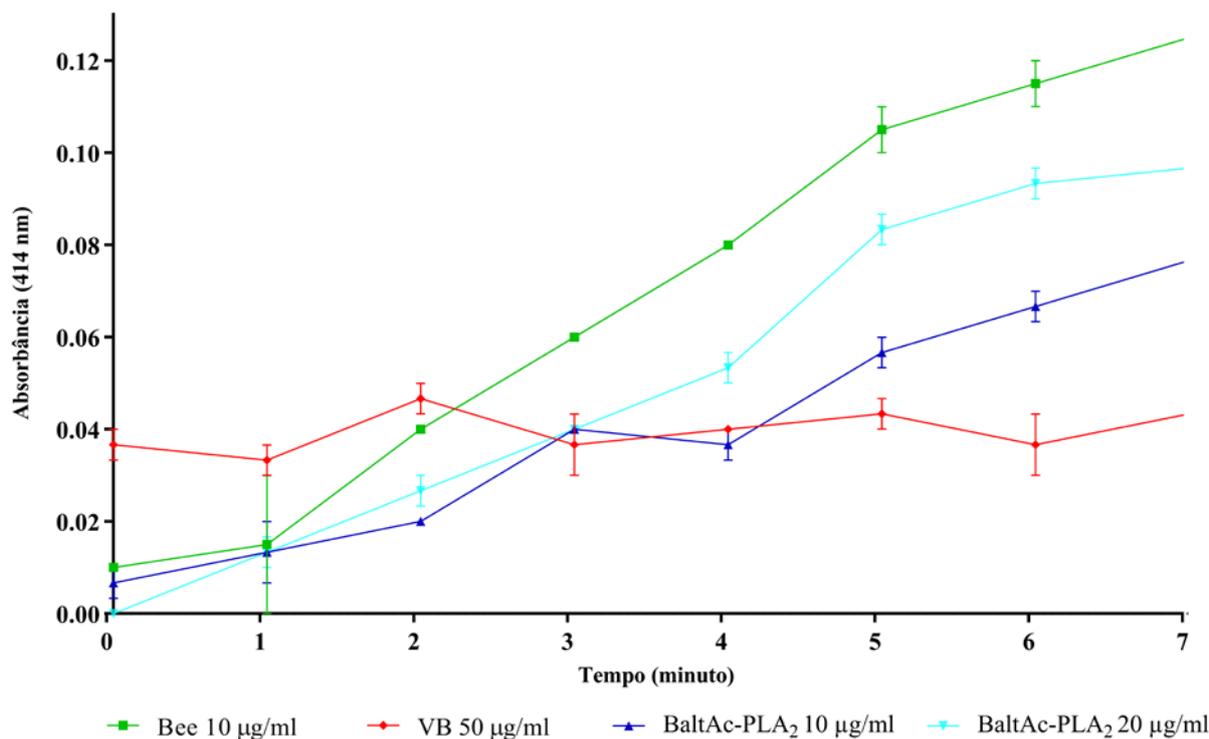


**Figura 10.** Cristais da BaltAc-PLA<sub>2</sub> obtidos em temperatura constante de 18°C após aproximadamente 20 dias. (A) Policristais formados na condição contendo cloreto de magnésio hexahidratado, Bis-tris e PEG 3350. (B) Monocristais obtidos na condição contendo fosfato di-amônio e acetato de sódio.

### 4.3 Atividades Enzimática e Biológicas

#### 4.3.1 Atividade Catalítica

Todas as amostras foram medidas a 414 nm, tendo um aumento gradativo de, aproximadamente, 0,02 unidades de absorvância / minuto para aquelas que apresentam atividade catalítica, como pode ser observado na Figura 11. O aumento na absorvância representa a liberação do produto da catálise, ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, o qual é gerado pela ação da fosfolipase A<sub>2</sub>.

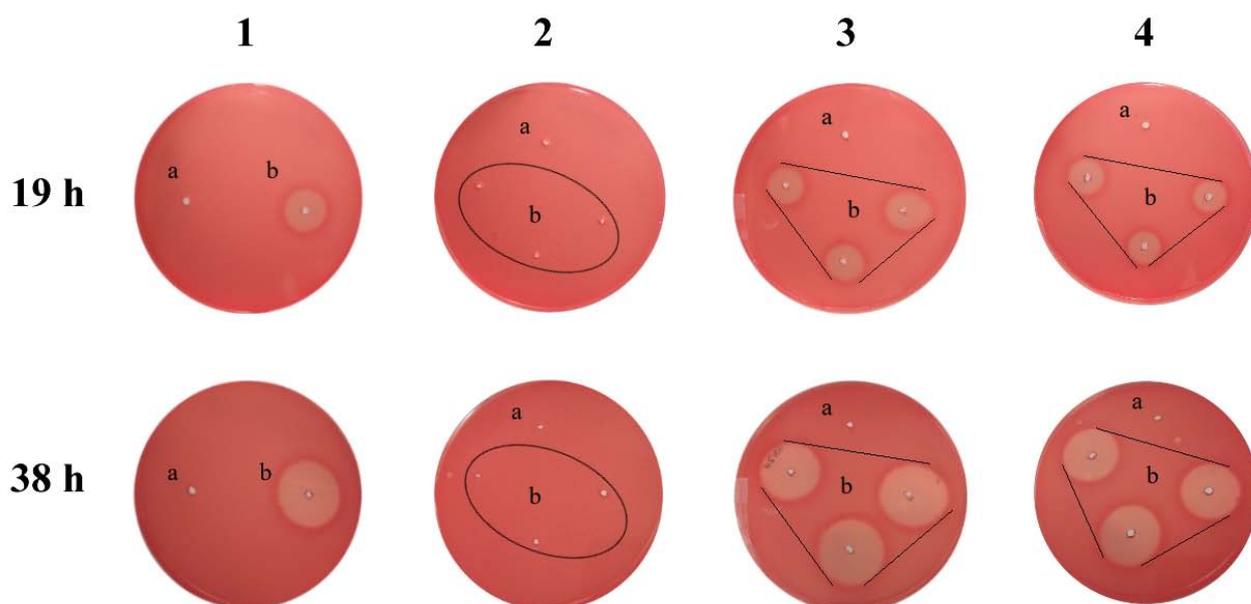


**Figura 11.** Atividade catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> representada através do aumento da absorbância a 414 nm devido à liberação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico. Bee: fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha (controle positivo); VB: peçonha bruta de *Bothrops alternatus*; BaltAc-PLA<sub>2</sub> em duas concentrações diferentes (10 e 20 µg).

A fosfolipase A<sub>2</sub> do veneno de abelha é o controle positivo do *kit sPLA<sub>2</sub> Assay*, já sendo conhecida sua ação catalítica sobre o substrato Diheptanoil Tio-PC. O controle positivo causou um aumento de aproximadamente 0,01 a 0,02 unidades de absorbância por minuto. A peçonha bruta de *B. alternatus* foi avaliada para comparar a ação catalítica desta com a da proteína isolada (BaltAc-PLA<sub>2</sub>). A peçonha bruta começou (0 min) com uma absorbância maior do que as demais amostras analisadas, indicando maior liberação do ácido 5-tio-2-nitrobenzóico, porém, não apresentou aumento gradativo na absorbância ao longo do tempo. Duas concentrações da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram avaliadas, 10 e 20 µg/ml, e ambas apresentaram aumento gradativo na absorbância, variando entre 0,01 a 0,02 unidades de absorbância / minuto, indicando a ação catalítica dessa enzima. Observou-se que a catálise do substrato foi dependente da concentração de BaltAc-PLA<sub>2</sub>, visto que a amostra de maior concentração catalisa mais substrato no mesmo tempo.

Adicionalmente, sendo de forma indireta sobre eritrócitos e gema de ovo, foi avaliada a atividade catalítica, na qual é observada a formação de um halo de catálise no substrato (Figura 12). A atividade catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (0,5 mg/mL) foi avaliada pela formação do halo de catálise de 15 mm após 19 horas, aumentando para 22 mm após 38 horas de incubação a 37° C (Tabela 2). Em comparação ao controle negativo (PBS), após 19 horas e 38 horas da incubação do

PBS com o substrato, não houve formação do halo de catálise (0 mm) (Tabela 2). Devido ao papel das PLA<sub>2</sub> catalíticas, bem como a BaltAc-PLA<sub>2</sub>, no envenenamento, foram utilizadas três moléculas candidatas a inibidores (varespladib, suramina e ácido rosmarínico), visando inibir a atividade biológica desta classe de proteína. A inibição da atividade catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (0,5 mg/mL) foi avaliada pela formação do halo de catálise após 19 e 38 horas de incubação da proteína + inibidor (1:10, sendo uma molécula de BaltAc-PLA<sub>2</sub> e dez de ligante, respectivamente).



**Figura 12.** Avaliação da atividade fosfolipásica indireta da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre eritrócitos e gema de ovo após 19 horas e 38 horas de experimento. **1.** (a) Controle negativo, PBS; (b) BaltAc-PLA<sub>2</sub> (0,5 mg/ml). **2.** (a) Varespladib sozinho; (b) BaltAc-PLA<sub>2</sub> + Varespladib. **3.** (a) Suramina sozinha; (b) BaltAc-PLA<sub>2</sub> + Suramina. **4.** (a) Ácido Rosmarínico sozinho; (b) BaltAc-PLA<sub>2</sub> + Ácido Rosmarínico.

**Tabela 2.** Diâmetro do halo de catálise formado pela ação catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub>.

	DIÂMETRO DO HALO DE CATÁLISE	
	19h	38h
<b>PBS</b>	0 mm	0 mm
<b>BaltAc-PLA<sub>2</sub></b>	15 mm	22 mm
<b>Varespladib</b>	0 mm	0 mm
<b>Varespladib + BaltAc-PLA<sub>2</sub></b>	0 mm	0 mm
<b>Suramina</b>	0 mm	0 mm
<b>Suramina + BaltAc-PLA<sub>2</sub></b>	13 mm	21 mm
<b>Ácido Rosmarínico</b>	0 mm	0 mm
<b>Ácido Rosmarínico + BaltAc-PLA<sub>2</sub></b>	12 mm	20 mm

Apenas o varespladib apresentou-se eficaz na inibição da ação catalítica de BaltAc-PLA<sub>2</sub>, ao inibir, de forma eficiente, a formação do halo de catálise. Para as moléculas de suramina e o ácido rosmarínico, houve uma ligeira diminuição do halo catalítico, a qual não é significativa quando comparada ao diâmetro do halo de catálise formado pela BaltAc-PLA<sub>2</sub> na ausência de inibidores.

Em adição, nas reações em que se pode observar a ação catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, na presença ou ausência de moléculas candidatas a inibidores (Figura 12), observou-se que o tamanho do halo de catálise foi diretamente proporcional ao aumento do tempo.

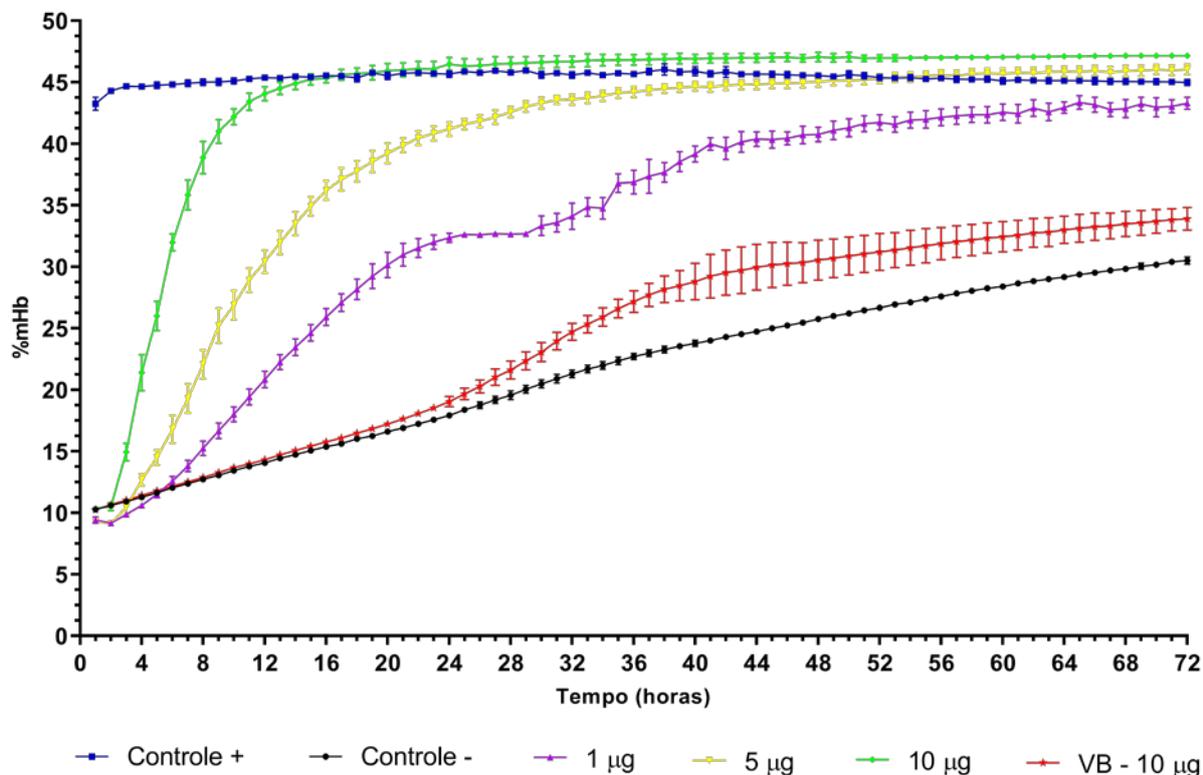
#### 4.3.2 Atividade Oxidante

A avaliação da atividade oxidante desencadeada pela BaltAc-PLA<sub>2</sub> e pela peçonha bruta de *Bothrops alternatus* sobre hemoglobinas humanas foi avaliada por 72 horas, sob temperatura constante de 25°C. Os dados das leituras espectrofotométricas a 630 nm (metahemoglobina) e a 540 nm (oxihemoglobina) foram coletados a cada hora, e a taxa de formação da metahemoglobina foi calculada com o emprego da equação #1 (vide metodologia). O aumento da taxa de oxidação da hemoglobina foi diretamente proporcional ao aumento da quantidade de BaltAc-PLA<sub>2</sub> e da peçonha bruta avaliada.

O efeito oxidante observado na solHb-CE causado pela presença da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi significativo e concentração-dependente. A quantidade de metahemoglobina formada espontaneamente (representada pelo controle negativo) e pelas quantidades de 1,0 e 5,0 µg da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foram similares nas primeiras três horas de experimentação com %mHb ~10%. Para a quantidade de 10 µg já na terceira hora, a quantidade de mHb formada foi de ~ 15%, aumentando para ~ 21% na quarta hora, e ~ 31 % de mHb formada na sexta hora de experimentação (Figura 13).

A taxa de metahemoglobina (%mHb) formada na presença de 10 µg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi avaliada com a finalidade de comparar o potencial oxidativo da peçonha bruta com a proteína isolada. A quantidade de 1,0 µg da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, após a 9ª hora, causou um aumento significativo na formação de mHb (%mHb ~16,6% e controle negativo: %mHb ~13,2%) e seguiu aumentando nas horas seguintes, até se estabilizar a partir da 43ª hora de experimentação (%mHb ~40% e controle negativo: %mHb ~24,5%). A quantidade de 5,0 µg apresentou uma taxa significativa já na 5ª hora (%mHb ~14,5% e controle negativo: %mHb ~11,6%), tendendo a se estabilizar após a 35ª hora com ~ 45% de formação de mHb. Para a quantidade de 10 µg, o aumento significativo se deu já na 3ª hora de experimentação (%mHb ~15% e controle negativo: %mHb ~10,9%), tendendo a se estabilizar após a 24ª hora com ~ 46% de formação de mHb, sendo

maior que a taxa de metahemoglobina formada pelo controle positivo, que se manteve em ~ 45% durante todo o experimento (Figura 13).

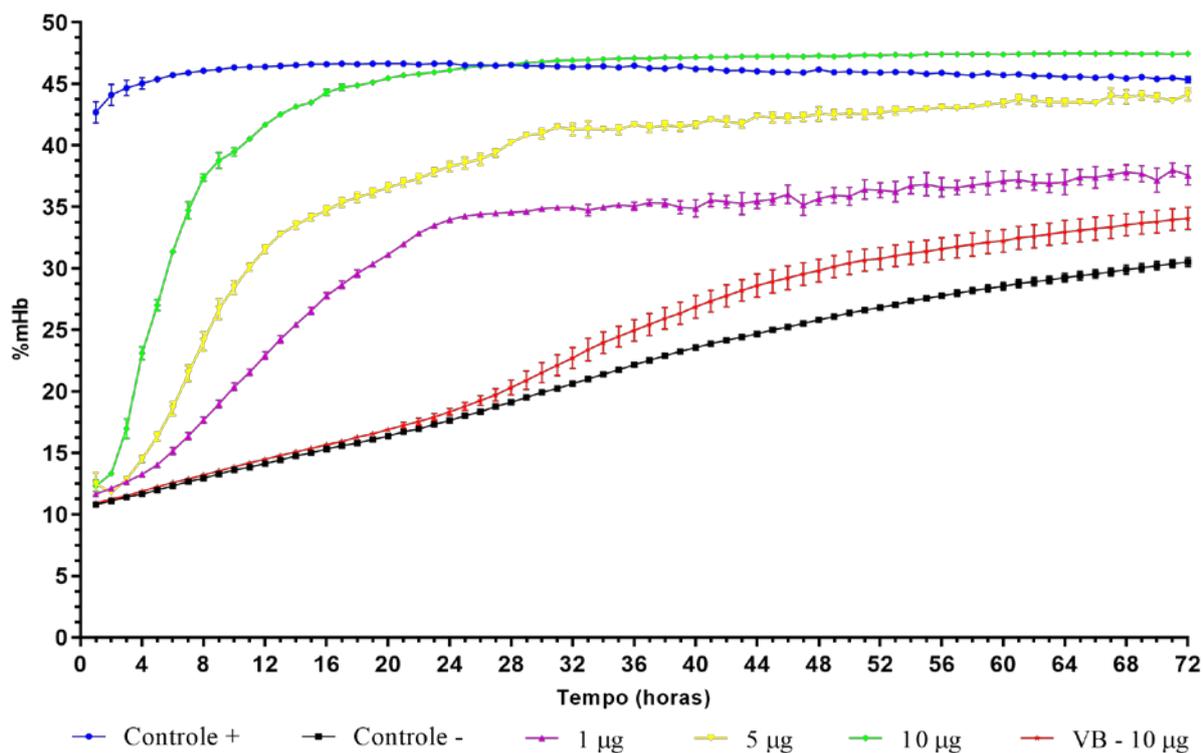


**Figura 13.** Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (1, 5 e 10 µg) e pela quantidade de 10 µg da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos humano tipo O+ (solHb-CE) a 5%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

O efeito oxidante observado na solHb-ST (Figura 14) causado pelas diferentes quantidades da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi semelhante ao observado para solHb-CE (Figura 13), significativo e concentração-dependente. O aumento significativo na quantidade de mHb formada na presença de 10 µg da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi observado na terceira hora de experimentação (%mHb ~17 % e controle negativo: %mHb ~ 11,4%), aumentando nas horas seguintes (%mHb ~23% na 4ª hora e %mHb ~31% na 6ª hora), e tendendo a se estabilizar após a 24ª hora (%mHb ~46,5% e controle negativo: %mHb ~17,6%). A formação de metahemoglobina no sangue total pela quantidade de 10 µg também foi superior ao controle positivo, que se manteve com %mHb ~45% durante todo o experimento (Figura 14).

A quantidade de metahemoglobina formada na presença de 1,0 e 5,0 µg da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre a solHb-ST foram similares nas primeiras três horas de experimentação (%mHb ~12 % e controle negativo %mHb ~11%). A quantidade de 1,0 µg, após a 9ª hora, causou aumento

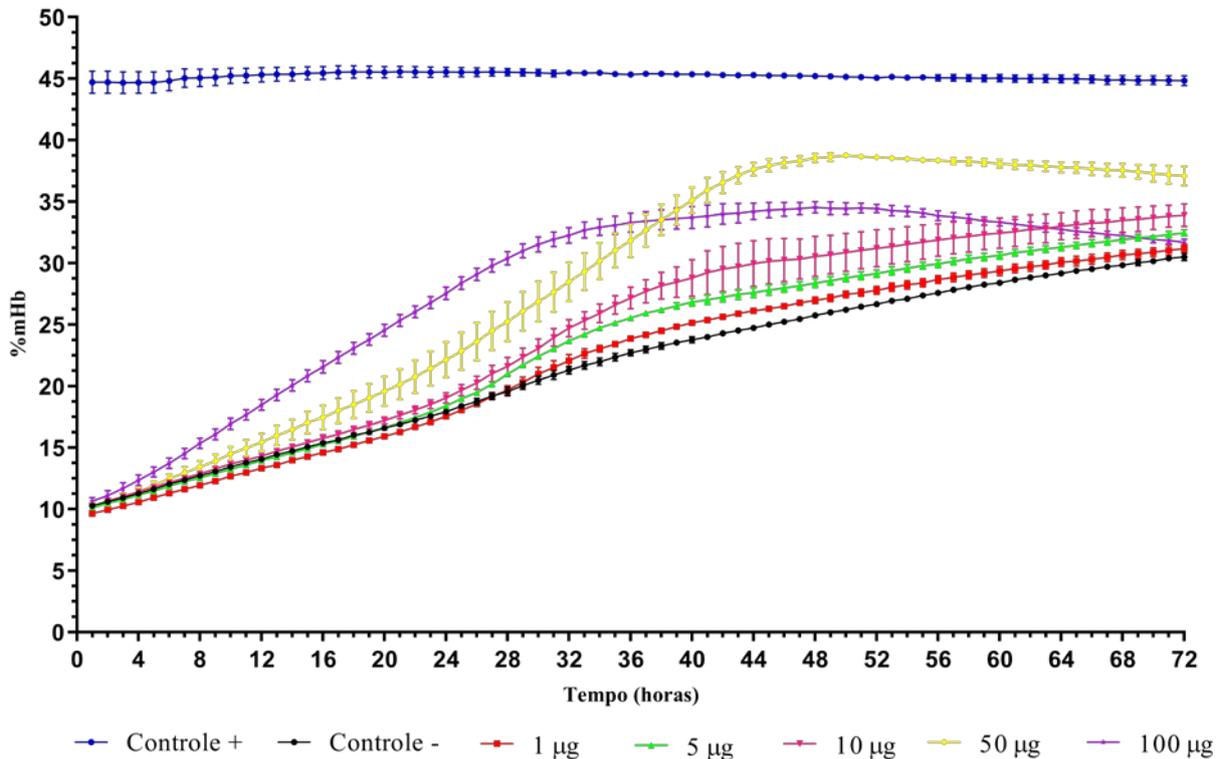
significativo na taxa de formação de mHb (%mHb ~19% e controle negativo: %mHb ~13,2%), aumentando nas horas seguintes até se estabilizar a partir da 35ª hora de experimentação (%mHb ~35,1% e controle negativo: %mHb ~21,7%). A quantidade de 5,0 µg, após a 5ª hora, causou aumento significativo na taxa de formação de mHb (%mHb ~16,3% e controle negativo: %mHb ~12%), aumentando nas horas seguintes até se estabilizar também a partir da 35ª hora (%mHb ~42% e controle negativo: %mHb ~21,7%) (Figura 14).



**Figura 14.** Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da BaltAc-PLA<sub>2</sub> (1, 5 e 10 µg) e pela quantidade de 10 µg da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes do sangue total humano do tipo O+ (solHb-ST) a 10%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

O efeito oxidante observado na solHb-CE causado pela presença da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi significativo e concentração-dependente, com exceção da quantidade de 1 µg (Figura 15). A quantidade de metahemoglobina formada espontaneamente, e pela presença das diferentes quantidades da peçonha de *Bothrops alternatus*, foram similares durante as primeiras sete horas de experimentação (Figura 15). A quantidade de 100 µg, após a 8ª hora, causou um aumento significativo na taxa de formação de mHb (%mHb ~15% e controle negativo: %mHb ~12%) e seguiu aumentando nas horas seguintes. A quantidade de 50 µg, na 17ª hora, apresentou uma taxa significante ~17% de formação de mHb e continuou aumentando nas leituras subsequentes. As quantidades de 10 µg e 5 µg provocaram aumentos significativos na taxa de

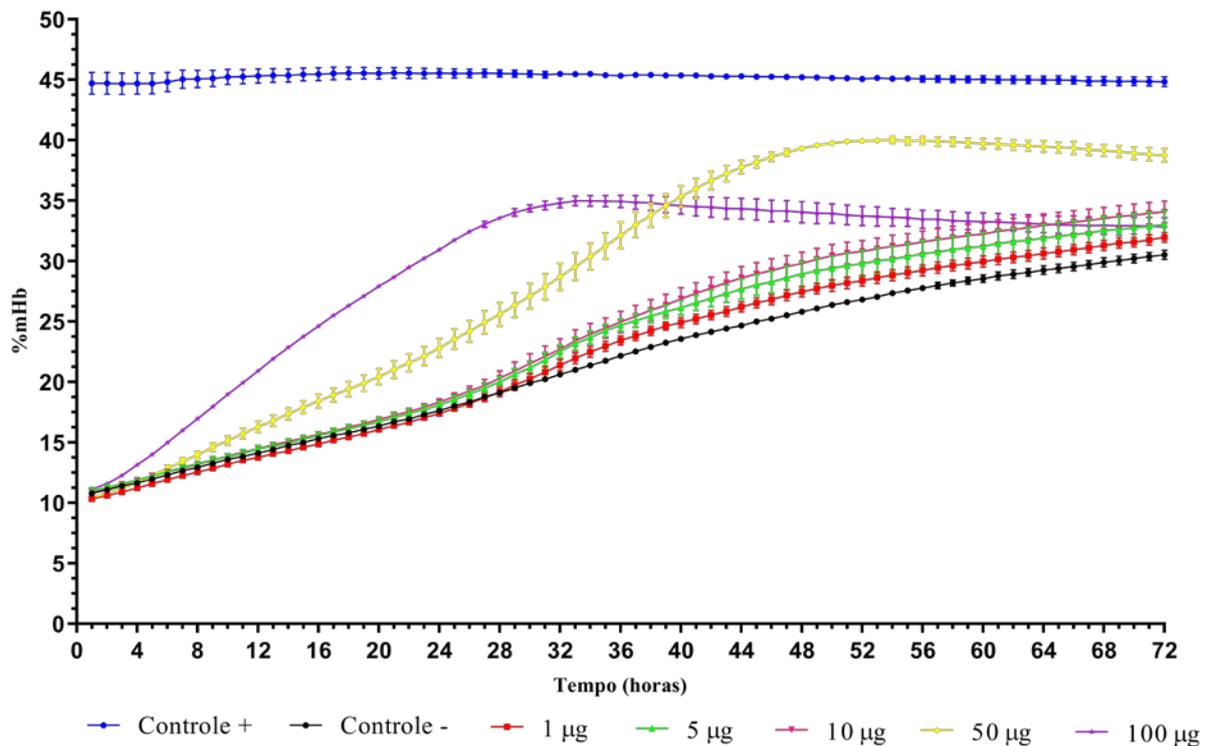
oxidação da hemoglobina durante as 29<sup>a</sup> (~22%) e 32<sup>a</sup> (~21%) horas de experimentação, respectivamente. Complementarmente, durante a 38<sup>a</sup> hora, as quantidades de 100 µg e 50 µg da peçonha bruta avaliada apresentaram a mesma porcentagem de formação %mHb (~33%). Nas horas seguintes, a quantidade de 100 µg apresentou menor taxa de formação de mHb do que a quantidade de 50 µg, a qual atingiu o valor máximo de oxidação na 50<sup>a</sup> hora, com 38% de formação de mHb, sendo esse valor o mais aproximado do controle positivo, que se manteve em ~45% durante todo o experimento.



**Figura 15.** Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de um concentrado de eritrócitos humano do tipo O+ (solHb-CE) a 5%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

O perfil de oxidação da solHb-ST causado por diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. alternatus* foi semelhante ao observado para solHb-CE (Figura 16). A taxa de formação de mHb na solHb-ST, devido à presença das diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. alternatus*, foram iguais ao controle negativo durante as primeiras 5 horas de experimentação. A quantidade de 100 µg apresentou atividade oxidante significativa (~15%) na 6<sup>a</sup> hora de avaliação, aumentando gradativamente nas horas seguintes. A quantidade de 50 µg expressou uma taxa de formação de mHb significativa (~16%) a partir da 12<sup>a</sup> hora, aumentando no decorrer do experimento. As quantidades de 5 µg e 10 µg provocaram um aumento significativo na taxa de

formação de mHb (ambos ~23%) somente após a 32<sup>a</sup> e 33<sup>a</sup> horas de experimentação, respectivamente. Complementarmente, durante a 38<sup>a</sup> hora, as quantidades de 100 µg e 50 µg apresentaram a mesma taxa de formação de mHb (~35%). Nas leituras subsequentes, a presença da quantidade de 50 µg da peçonha bruta causou a oxidação da oxi-hemoglobina em metahemoglobina máxima de ~40% na 50<sup>a</sup> hora de experimentação, sendo a taxa que mais se aproximou do valor obtido no controle positivo, o qual se manteve em ~45% durante todo o experimento (Figura 16).



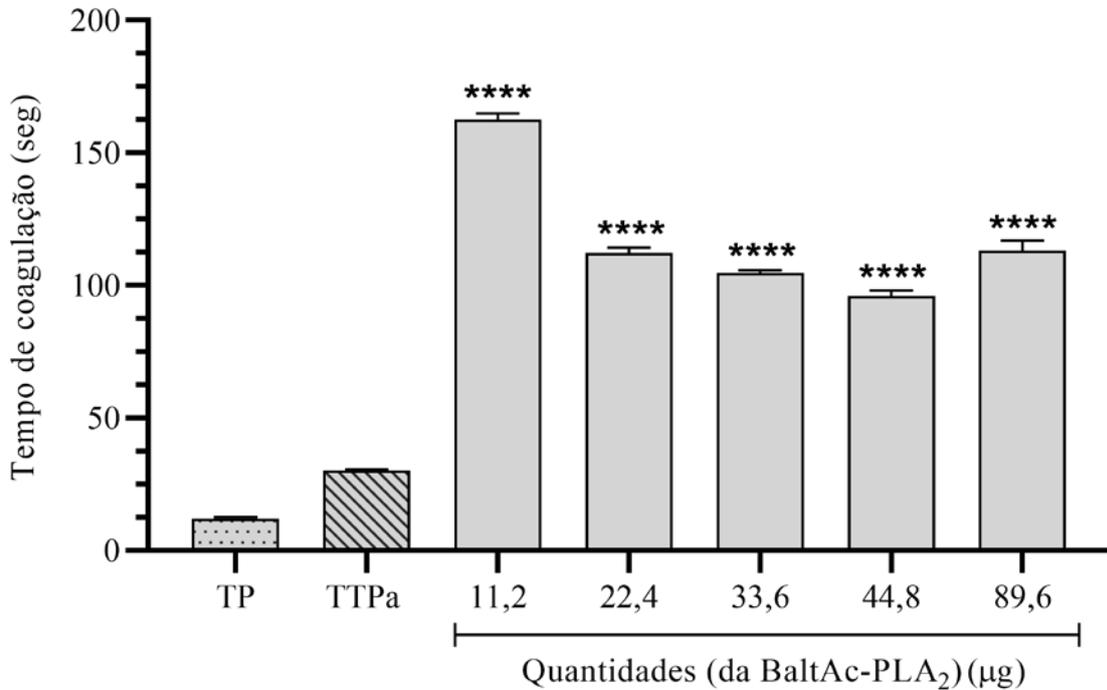
**Figura 16.** Efeito oxidante causado pela presença de diferentes quantidades da peçonha bruta de *B. alternatus* sobre hemoglobinas provenientes de sangue total humano do tipo O+ (solHb-ST) a 10%. Controle positivo: fenilhidrazina; Controle negativo: PBS. Os resultados foram expressos como média ± erro padrão da média.

### 4.3.3 Atividade Coagulante

Os testes de TP (Tempo de Protrombina) e TTPa (Tempo de Tromboplastina) são considerados testes de triagem da coagulação e foram utilizados como controles da hemostasia. A comparação entre TP e todas as quantidades (11,2; 22,4; 33,6; 44,8 e 89,6 µg) da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi significativa, bem como a comparação destas com TTPa.

Os resultados da atividade coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre plasma humano citratado indicaram que a toxina apresenta formação de coágulo em todas as quantidades avaliadas. O

tempo para formação do coágulo plasmático diminuiu conforme houve o aumento da quantidade da BaltAc-PLA<sub>2</sub> avaliada. Porém, foi observado o aumento do tempo para a formação do coágulo plasmático na maior quantidade avaliada (89,6 µg).



**Figura 17.** Avaliação da atividade coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> em cinco diferentes quantidades (11,2; 22,4; 33,6; 44,8 e 89,6 µg). TP: Tempo de Protrombina e TTPa: Tempo de Tromboplastina Parcial Ativada. TP e TTPa foram utilizados para controle da hemostasia, e comparados com a toxina isolada, solubilizada em PBS 10x (pH 7,4) sobre plasma humano citratado. Resultados expressos como média ± erro padrão da média (EPM) (n=3), onde ns: não significativo para valor de p>0,05. Valores de p<0,05 foram considerados significativos (\*: valor de p<0,01; \*\*: valor de p<0,001; \*\*\*: valor de p<0,0001 e \*\*\*\*: valor de p<0,00001).

## 5. DISCUSSÃO

Uma classe proteica importante envolvida nos efeitos fisiopatológicos do envenenamento ofídico são as fosfolipases A<sub>2</sub>, que causam efeitos miotóxicos, neurotóxicos, cardiotoxicos, inflamatórios e hematológicos. Estas PLA<sub>2</sub>s contribuem para o entendimento desses efeitos a partir da sua caracterização bioquímica (DIAS *et al.*, 2018; GUTIÉRREZ, LOMONTE, 1995; KINI, 2003). Neste trabalho, uma fosfolipase A<sub>2</sub>, nomeada BaltAc-PLA<sub>2</sub>, foi purificada da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* e caracterizada por análises biofísicas, bioquímicas e farmacológicas.

A análise da fração obtida na cromatografia líquida de fase reversa, segundo e último passo de purificação, foi realizada por SDS-PAGE e espectrometria de massas. A análise por SDS-PAGE indicou que a proteína estava com alto grau de pureza, visto que apresentou apenas uma banda no gel. Considerando que a purificação de PLA<sub>2</sub> botrópica é comumente realizada em três ou mais etapas cromatográficas, a exemplo da purificação de BaltTX-II de *B. alternatus* (SETÚBAL *et al.*, 2013), BmooTX-I de *B. moojeni* (SANTOS-FILHO *et al.*, 2008) e BI-PLA<sub>2</sub> de *B. leucurus* (NUNES *et al.*, 2011), pode-se dizer que o processo de purificação utilizado neste trabalho foi eficiente.

Quanto à caracterização, a identificação de proteínas por meio da espectrometria de massas depende da digestão proteolítica que produz uma coleção de peptídeos (PENNINGTON, DUNN, 2001). O software PatternLab possibilitou a comparação dos fragmentos obtidos pela espectrometria de massas com o banco de dados do Swiss-Prot (na taxonomia *Bothrops*), confirmando que a proteína isolada é uma fosfolipase A<sub>2</sub>. Esta apresentou homologia com apenas uma outra PLA<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops alternatus*, isolada por Denegri *et al.* (2010) (Figura 6), denominada Ba SpII RP4, a qual está presente no UNIPROT sob código P86456. Contudo, a sequência experimental da BaltAc-PLA<sub>2</sub> também está presente em outros dezessete tipos de PLA<sub>2</sub> identificadas no UNIPROT, todas do gênero *Bothrops*, sendo de outras espécies. Entre elas, estão: *Bothrops moojeni*, *B. erythromelas*, *B. jararacussu*, *B. pauloensis*, *B. leucurus*, *B. aspere* *B. brazili* (vide tabela 1).

De acordo com Scott (1997), as PLA<sub>2</sub>s de *Bothrops* apresentam alta homologia, chegando a compartilhar de 40 – 99% de identidade em suas sequências de aminoácidos e, conseqüentemente, similaridade na sua estrutura tridimensional. Uma das regiões essenciais do mecanismo de catálise das sPLA<sub>2</sub>s é a rede catalítica, formada pelos resíduos: His<sup>48</sup>, Asp<sup>49</sup> e Tyr<sup>52</sup> (SCOTT *et al.*, 1990a; ARNI, WARD, 1996). A análise da sequência experimental da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, obtida por experimentos de espectrometria de massas, mostrou a presença de resíduos

responsáveis pela atividade catalítica desta classe de proteínas em posições conservadas, sendo os resíduos de histidina, ácido aspártico e tirosina nas posições 48, 49 e 52, respectivamente.

Foram realizados experimentos de caracterização biofísica para avaliar as dimensões de partículas em suspensão (DLS), verificar a integridade da estrutura secundária de BaltAcPLA<sub>2</sub> (CD) e a obtenção de cristais que possam fornecer um bom conjunto de difração de raios X (cristalização). Os experimentos de Dicroísmo Circular (CD) mostraram que a BaltAc-PLA<sub>2</sub> apresenta integridade e enovelamento estrutural, e que seu enovelamento é semelhante ao da BthTX-II (Asp<sup>49</sup>-PLA<sub>2</sub> da peçonha de *Bothrops jararacussu*), proteína da mesma classe, que também possui atividade catalítica. O DLS possibilitou saber se a amostra em questão é monodispersa ou polidispersa, e se apresenta algum tipo de oligômero (monômero, dímero, trímero, tetrâmero ou oligômeros). O experimento de DLS é realizado em diferentes condições para saber em qual delas se tem os melhores resultados de monodispersão. Sabe-se que a elevada polidispersividade (Pd) pode resultar em dificuldade na obtenção de monocristais, pois indica que a distribuição de tamanho molecular da proteína está heterogênea, demonstrando diversos estados oligoméricos na solução e, conseqüentemente, dificultando a devida cristalização da proteína (SALVADOR *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2010; CARDOSO *et al.*, 2018).

Nesse estudo, os resultados de DLS mostraram uma polidispersividade (Pd) de 8,1% da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, confirmando ser uma amostra monomodal e monodispersa, com baixo valor de Pd. Porém, na forma de um oligômero composto por, aproximadamente, sete moléculas, o que não impediu o processo de cristalização da BaltAc-PLA<sub>2</sub>.

Para os experimentos de cristalização, o método usado neste trabalho foi o de difusão de vapor no sistema *sitting drop*. Policristais foram obtidos nas condições contendo 0,2 M de Cloreto de magnésio hexahidratado, 0,1 M de Bis-tris, pH 5,5 e 25% de PEG 3350, e na condição com os compostos: 0,2 M de Cloreto de sódio, 0,1 M de fosfato/citrato pH 4,2 e 20% PEG 8000. Um monocristal foi obtido na condição contendo 1,0 M de Fosfato di-amônio e 0,1 M de Acetato de sódio, pH 4,5. Após a obtenção de monocristais que possibilitem a realização de experimentos de difração de raios X, visamos elucidar a estrutura tridimensional da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, podendo, assim, realizar a análise estrutural e melhor compreender os mecanismos de ação dessa classe de proteína e seu papel no envenenamento.

As PLA<sub>2</sub>s são as principais proteínas tóxicas do veneno e têm um papel importante na imobilização e captura da presa. De acordo com Bulfone *et al.* (2018), estas enzimas apresentam uma ampla variedade de efeitos farmacológicos, entre eles estão: miotoxicidade (mionecrose local e miotoxicidade sistêmica), neurotoxicidade pré-sináptica, cardiotoxicidade e coagulotoxicidade.

De acordo com Ponce-Soto *et al.* (2010), as fosfolipases A<sub>2</sub> são descritas na literatura como altamente estáveis e resistentes ao calor, ácidos e uréia, porém a atividade catalítica é diminuída em pH básicos. A resistência da fosfolipase A<sub>2</sub> foi observada neste trabalho nos experimentos de atividade fosfolipásica indireta, nos quais a BaltAc-PLA<sub>2</sub> se manteve ativa, exercendo sua atividade catalítica, mesmo após 38 horas (Figura 12). A BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi solubilizada em tampão formato de amônio (pH 3,5) para realização dos experimentos de atividade catalítica. Logo, o potencial hidrogeniônico (pH) foi baixo, garantindo a alta ação catalítica dessa enzima (Figura 12).

Uma grande variedade de inibidores de PLA<sub>2</sub>s é encontrada na literatura, atuando contra os efeitos inflamatórios destas enzimas. Sendo a maioria inibidores competitivos que competem com o substrato fosfolipídico pelo sítio ativo da enzima (SINGH *et al.*, 2005; JABEEN *et al.*, 2005). Dentre estes, estão: compostos indólicos (OSLUND *et al.*, 2008), peptídeos sintéticos (SINGH *et al.*, 2003), vitamina E (CHANDRA *et al.*, 2002a), flavonóides (LATTIG *et al.*, 2007) e outras substâncias de extrato de plantas (MISHRA *et al.*, 2000). Aqui, foi avaliado o potencial de inibição de três inibidores candidatos: varespladib, suramina, e ácido rosmarínico.

A suramina é um agente terapêutico sintético derivado da naftiluréia polissilfonado, desenvolvido e utilizado no tratamento de doenças de tripanossomíase africana e oncorceciase (ARAGÃO *et al.*, 2012). De acordo com Aragão (2009), a suramina se liga à PLA<sub>2</sub> humana secretada do grupo IIA, resultando na inibição da atividade catalítica e ativação de macrófagos. Neste estudo, a atividade catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub> pertencente ao grupo IIA da família Viperidae não foi inibida pela suramina, visto que, na ausência deste inibidor, a ação da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre o substrato formou um halo de catálise de 15 e 25 mm de diâmetro, às 19 e 38 horas de incubação, respectivamente. Enquanto que, na presença da suramina, o diâmetro diminuiu apenas dois milímetros com 19 horas de incubação (13mm), e um milímetro com 38 horas (21 mm) (Figura 13; Tabela 3).

Assim como a suramina, o ácido rosmarínico também não foi eficiente na inibição da atividade catalítica, diminuindo o diâmetro do halo de catálise em apenas três milímetros às 19 horas e dois milímetros às 38 horas (Figura 13; Tabela 3). O ácido rosmarínico (AR) é um éster dos ácidos caféico e 3,4-di-hidroxifenilático, encontrado em diversas espécies vegetais, tais como a *Salvia officinalis* L. (sálvia) e o *Rosmarinus officinalis* (alecrim). Os principais efeitos do AR estudados até o momento são os efeitos antioxidantes, anti-inflamatórios, antidepressivo e supressor (TEUSCHER, 2006; PETERSEN, SIMMONDS, 2003).

Diferentemente das outras duas moléculas citadas anteriormente, o varespladib inibiu, de forma eficiente, a atividade catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub>, não havendo formação do halo de catálise

sobre o substrato (0mm – Figura 13; Tabela 3). Varespladib é um conhecido inibidor da classe de toxinas PLA<sub>2</sub>s secretadas. Seu derivado oral, metil-vaespladib, é um candidato promissor para o tratamento prévio do envenenamento por peçonhas de serpentes ricas em enzimas PLA<sub>2</sub>s (GUTIÉRREZ *et al.*, 2020; LEWIN *et al.*, 2016).

De acordo com Salvador (2019), o vaespladib atua bloqueando a ativação alostérica de MjTX-II (PLA<sub>2</sub> miotóxica), inibindo a interação da toxina com as superfícies da membrana. Além de bloquear a ativação alostérica das PLA<sub>2</sub>s, o vaespladib se liga ao canal hidrofóbico dessas toxinas, impedindo o alinhamento dos locais funcionais das toxinas com os substratos (SALVADOR, 2019). Youngman (2020) sugere que as toxinas PLA<sub>2</sub>s da peçonha da serpente *Bitis sp* são responsáveis pela inibição da protrombinase, e que esse efeito pode ser neutralizado pelo vaespladib.

Embora o antiveneno seja um tratamento eficaz para o ofidismo, sua eficiência é dependente de várias condições, como o acometido ser capaz de viajar para um hospital próximo e em tempo hábil, disponibilidade do antiveneno no hospital e especificidade para serpente que causou o empeçonhamento (BULFONE *et al.*, 2018). Assim, é de grande importância a busca por moléculas que neutralizem os efeitos tóxicos da peçonha, e que possam ser utilizadas previamente à ida ao hospital, aumentando a possibilidade do tratamento com o antiveneno específico nos pacientes. Youngman e colaboradores (2020) relatam a eficácia potencial do vaespladib, também observada neste trabalho, para o tratamento de envenenamentos por espécies de serpentes que são conhecidas por possuírem peçonhas ricas em PLA<sub>2</sub>. Estes autores afirmam que o vaespladib ou seu derivado oral metil-vaespladib poderiam ser administrados no campo, imediatamente após o envenenamento, antes do tratamento hospitalar, neutralizando os efeitos tóxicos das fosfolipases A<sub>2</sub> (YOUNGAMAN, *et al.*, 2020).

As PLA<sub>2</sub>s apresentam atividade sobre uma variedade de células, especialmente nos eritrócitos (hemólise) e nas células do músculo esquelético (rabdomiólise), contribuindo largamente para o estresse oxidativo (BARONE *et al.*, 2014). Ao entrar no sistema circulatório, as PLA<sub>2</sub>s causam hemólise, devido à quebra dos lipídeos de membrana dos eritrócitos, o que resulta na liberação da hemoglobina (Hb). Quando livre de células, a Hb sofre oxidação espontânea e também reage com o óxido nítrico (NO), gerando metahemoglobina (mHb). A mHb é altamente pró-oxidante na natureza e pode liberar heme férrico, que pode atravessar facilmente a membrana celular e aumentar a atividade oxidante de células próximas (ROTHER *et al.*, 2005).

O efeito oxidativo causado por peçonhas ofídicas ainda é pouco descrito e as interações entre estas e a hemoglobina não são completamente compreendidas (SUNITHA *et al.*, 2015; WILLIAM *et al.*, 2018). Contudo, Meléndez-Martinez e colaboradores (2017) apontam que a

formação de metahemoglobina esteja relacionada ao peróxido ( $H_2O_2$ ), subproduto da catálise enzimática da enzima L-aminoácido oxidase (LAAO). Complementarmente, estudos já relataram uma correlação da peçonha ofídica com a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) (SHARMA, *et al.*, 2015; SANTHOSH *et al.*, 2016).

William e colaboradores (2018) inferiram que o  $H_2O_2$  pode interagir com o ferro ( $Fe^{2+}$ ) presente na hemoglobina e gerar outras EROs pela reação de Fenton. Contudo, em seus estudos com a peçonha de *N. nigricollis*, foi evidenciado que esta não apresenta svLAAO, porém, foi observada uma abundância da enzima Fosfolipase  $A_2$ .

Neste trabalho, foi avaliada a atividade oxidante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> sobre soluções de hemoglobina a partir da formação de metahemoglobina, a qual pode ser lida em 630nm. O aumento da taxa de oxidação foi diretamente proporcional ao aumento na quantidade de BaltAc-PLA<sub>2</sub> avaliada, indicando que a ação oxidativa desencadeada por essa toxina é concentração-dependente (Figuras 13 e 14). Na quantidade de 10  $\mu g$ , não foi observada diferença significativa entre as duas soluções (SolHb-CE e SolHb-ST). Já nas quantidades de 1,0 e 5,0  $\mu g$ , houve diferença significativa entre as duas soluções em algumas horas durante a experimentação, a exemplo da terceira hora de experimentação.

A atividade oxidante da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* também foi observada a partir da formação de metahemoglobina. A comparação entre as duas soluções utilizadas nesse experimento (SolHb-CE e SolHb-ST) não apresentou significância para todas as quantidades avaliadas, com exceção da quantidade de 100  $\mu g$ . Esta apresentou uma pequena diferença entre as soluções a partir da 15ª hora de experimentação, sendo pouco significativa. Contudo, a partir da 31ª hora, a diferença entre a SolHb-CE e SolHb-ST na quantidade de 100  $\mu g$  voltou a ser não significativa (Figuras 15 e 16).

A comparação entre as taxas de oxidação da BaltAc-PLA<sub>2</sub> com as da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* foi altamente significativa. A BaltAc-PLA<sub>2</sub> apresentou um potencial oxidativo superior à peçonha bruta, em ambas as soluções avaliadas (SolHb-CE e SolHb-ST). Sugere-se que isto esteja relacionado ao fato de que a quantidade de proteína isolada utilizada no experimento é superior a que está presente na peçonha bruta. Os resultados mostram que as fosfolipases  $A_2$ , como sugerido por William *et al.* (2018), são um dos componentes da peçonha responsáveis pela formação de metahemoglobina.

Quanto aos experimentos de coagulação, a atividade coagulante da BaltAc-PLA<sub>2</sub> foi avaliada em plasma humano citratado e os resultados mostraram que o tempo de formação do coágulo diminuiu com o aumento da quantidade de PLA<sub>2</sub> utilizada, com exceção da maior quantidade avaliada. Sugere-se que a BaltAc-PLA<sub>2</sub> induza a formação do coágulo plasmático nas

menores quantidades e iniba nas maiores quantidades, assim como demonstra o estudo de Kini (1990) sobre a agregação plaquetária, em que algumas  $PLA_2$ s apresentam efeitos bifásicos, provocando a agregação plaquetária em baixas concentrações e desagregação em concentrações elevadas.

## 6. CONCLUSÕES

- ✓ Foi isolada uma PLA<sub>2</sub> da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* por meio de dois passos de purificação, sendo cromatografia líquida de troca iônica seguido de cromatografia líquida de fase reversa.
- ✓ O ensaio de SDS-PAGE indicou que a toxina isolada apresenta massa molecular de aproximadamente 14 kDa e, junto às análises de espectrometria de massas, identificaram a toxina como sendo uma PLA<sub>2</sub>, a qual denominamos BaltAc-PLA<sub>2</sub>. Esta toxina apresenta homologia com várias PLA<sub>2</sub> de caráter ácido presentes nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops*.
- ✓ Quanto aos experimentos de caracterização biofísica (CD, DLS e Cristalização), a BaltAc-PLA<sub>2</sub> apresentou integridade e enovelamento estrutural, e baixa polidispersividade, tendo sido obtido um monocristal no experimento de cristalização.
- ✓ Quanto aos experimentos de atividades enzimática e biológicas, a BaltAc-PLA<sub>2</sub> apresentou atividade catalítica e oxidante, e pró-coagulante nas menores concentrações.
- ✓ Dentre os candidatos a inibidores (suramina, varespladib e ácido rosmarínico), apenas o varespladib inibiu completamente a atividade catalítica da BaltAc-PLA<sub>2</sub>.
- ✓ A BaltAc-PLA<sub>2</sub> apresentou um potencial oxidativo superior à peçonha bruta, em ambas as soluções avaliadas (SolHb-CE e SolHb-ST).
- ✓ A BaltAc-PLA<sub>2</sub> induziu a formação de coágulo plasmático em todas as quantidades avaliadas, com exceção da última quantidade (89,6 µg).

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; FLORES-DÍAZ, M.; MADRIGAL, M.; SASA, M.; CALVETE, J. J. Snake Venomics of the Lance head Pit viper *Bothrops asper*: geographic, individual, and ontogenetic variations. **J Proteome Res.**, 7:3556-71, 2008.
- ARAGAO, E.A.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T.L. MEDEIROS, A.I.; SECATTO, A.; FACCIOLI, L.H.; WARD, R.J. Suramin inhibits macrophage activation by human group IIA phospholipase A<sub>2</sub>, but does not affect bactericidal activity of the enzyme. **Inflamm. Res.** 58:210-217, 2009.
- ARAGAO, E.A.; VIEIRA, S.D.; CHIOATO, L.; FERREIRA, T.L.; LOURENZONI, M.R.; SILVA, S.R.; WARD, R.J. Characterization of suramin binding sites on the human group IIA secreted phospholipase A<sub>2</sub> by site-directed mutagenesis and molecular dynamics simulation. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 519:17-22, 2012.
- ARAÚJO, F.A.A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R.F. Epidemiologia dos Acidentes por Animais Peçonhentos, Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes, Sarvier, São Paulo, 2003.
- ARNI, R. K. e WARD, R. J. Phospholipase A<sub>2</sub> – a structural review. **Toxicon**, 34:827-841, 1996.
- BAHNSON, B.J. Structure, function and interfacial allostereism in phospholipase A<sub>2</sub>: insight from the anion-assisted dimer. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, 433:96–106, 2005.
- BARONE, J. M.; FREZZATTI, R.; SILVEIRA, P. F. Effects of N-acetyl-l-cysteine on redox status and markers of renal function in mice inoculated with *Bothrops jararaca* and *Crotalus durissus terrificus* venoms. **Toxicon**, 79:1-10, 2014.
- BERNARDE, P.S. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil, São Paulo: **Anolisbooks**, 2014.
- BJARNASON, J.B.; FOX, J.W. Hemorrhagic Metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther**, 62:325-372, 1994.
- BORGES, R.J. Estudos estruturais com fosfolipases A<sub>2</sub> homólogas de veneno botrópico em presença de íons com importância funcional. Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências de Botucatu, 2012.

BRADFORD, M. A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Anal. Biochem.** 72:248-254, 1976.

BRASIL, Ministério da Saúde, Portal Saúde, Acidentes por animais peçonhentos – serpentes, 2018. Disponível em: <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes> (acessado em 24 de julho de 2020).

BRASIL, Ministério da Saúde, SINAN - Sistema de Informação de Agravos de Notificação: Acidente por Animais Peçonhentos, 2019. Disponível em: <http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/tabcgi.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def> (acessado em 24 de julho de 2020).

BULFONE, T.; SAMUEL, S.; BICKLER, P.; LEWIN, M. Small molecule therapeutics for the initial and adjunctive treatment of snakebite. **J. Trop. Med.**, 2018.

BURLEY, S.K. Dynamic light scattering in evaluating crystallizability of macromolecules. **Methods Enzymol.**, 276:57-68, 1997.

CALVETE, J.J.; BORGES, A.; SEGURA, A.; FLORES-DIAZ, M.; ALAPE-GIRON, A.; GUTIERREZ, J.M.; DIEZ, N.; DE SOUSA, L.; KIRIAKOS, D.; SANCHEZ, E.; FAKS, J.G.; ESCOLANO, J.; SANZ, L. Snake venomomics and antivenomics of *Bothrops colombiensis*, a medically important pit viper of the *Bothrops atrox* – *asper* complex endemic to Venezuela: Contributing to its taxonomy and snakebite management. **J Proteomics**, 72: 227-40, 2009.

CAMPBELL, J.A.; LAMAR, W.W. The Venomous Reptiles of Latin América. **Comstok**, 6<sup>a</sup> ed., p.425, 1989.

CARDOSO, F. F.; BORGES, R. J.; DREYER, T. R.; SALVADOR, G. H. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; PAI, M. D.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Structural basis of phospholipase A2-like myotoxin inhibition by chicoric acid, a novel potent inhibitor of ophidian toxins. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, 1862:2728:2737, 2018.

CHANDRA, V.; JASTI, J.; KAUR, P.; BETZEL, C.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. First structural evidence of a specific inhibition of phospholipase A2 by alpha-tocopherol (vitamin E) and its implications in inflammation: crystal structure of the complex formed between phospholipase A2 and alpha-tocopherol at 1.8 Å resolution. **J Mol Biol**, 320:215-22, 2002a.

CHIPPAUX, J. P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease. **J. Venom Anim. Toxins. Incl. Trop. Dis.** 23:38-39, 2017.

CUNHA, E.M.; MARTINS, O.A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, 02:21-26, 2012.

DENEGRI G.M.E.; ACOSTA, O.C.; HUANCAHUIRE-VEJA, S. *et al.* Isolation and functional characterization of a new acidic PLA(2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. **Toxicon**, 56:64-74, 2010.

DENNIS, E.A.; CAO, J.; HSU, YUAN-HAO.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A2 Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chemical Reviews**, 111: 6130-6185, 2011.

DE PAULA, R.; CASTRO, H.; RODRIGUES, C.; MELO, P.; FULY, A. Structural and pharmacological features of phospholipases A2 from snake venoms. **Protein Pept. Lett.**, 16:899-907, 2009.

DIAS, E.H.V.; PASCHOAL, T.S.; SILVA, A.P.; PEREIRA, D.F.C.; SINAMOTO, B.B.S.; MATIAS, M.S.; SANTIAGO, F.M.; ROSA, J.C.; SOARES, A. SANTOS-FILHO, N.A.; OLIVEIRA, F.; MAMEDE, C.C.N. BaltPLA2: A New Phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops Alternatus* Snake Venom with Antiplatelet Aggregation Activity. **Protein and Peptide Letters**, 25:943-952, 2018.

DUCRUIX, A.; GIEGÉ, R. Crystallization of nucleic acids and proteins: A practical approach. **New York: Oxford University Press**, 331p., 1992.

FERNANDES, C. A.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. M.; SILVA, M. C.; COSTA, T. R.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R. Comparison between apo and complexed structures of *Bothrops* toxin-I reveals the role of Lys122 and Ca (2+) – binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA(2)s. **J Struct Biol**, 171:31-43, 2010.

GOMES, M.S.R.; MENDES, M.M.; OLIVEIRA, F. DE, *et al.* BthMP: a new weakly hemorrhagic metallo proteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, 53:24-32, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini; R.M.; (ed.). **Venom Phospholipase A<sub>2</sub> Enzymes: Structure, Function and Mechanism**, 321-352; 1997.

GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, 33:1405-1424, 1995.

GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A<sub>2</sub>: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. **Toxicon**, 42:915-931, 2003.

GUTIERREZ, J. M.; THEAKSTON, R. D.; WARRELL, D. A. Confronting the neglected problem of snake bite envenoming: the need for a global partnership. **PLoS Med**, 3: e150, 2006.

GUTIÉRREZ, J.M.; LEWIN, M.R.; WILLIAMS, D.; LOMONTE, B. Varespladib (LY315920) and methyl varespladib (LY333013) abrogate or delay lethality induced by presynaptically acting neurotoxic snake venoms. **Toxins**, 12, 131, 2020.

HODGSON, W.C.; ISBISTER, G.K. The application of toxins and venoms to cardiovascular drug Discovery. **Currente Opinions in Pharmacology**, 9:173-176, 2009.

HOLLAND, D. R., CLANCY, L. L., MUCHMORE, S. W., RYDE, T. J., EINSPAHR, H. M., FINZEL, B. C., HEINRIKSON, R. L. e WATENPAUGH, K. D. **J Biol Chem**, 265:17649-17656, 1990.

ISBISTER, G.K.; SILVA, A. Addressing the global challenge of snake envenoming. **Lancet**, 392: 619–620, 2018.

JABEEN, T.; SINGH, N.; SINGH, R.K.; SHARMA, S.; SOMVANSHI, R.K.; DEY, S.; SINGH, T.P. Non-steroidal anti-inflammatory drugs as potent inhibitors of phospholipases A<sub>2</sub>: structure of complex of phospholipase A<sub>2</sub> with niflumic acid at 2.5 Angstroms resolution. **Acta Crystallogr**, 61:1579-86, 2005.

JAIN, D.; KUMAR, S. Snakevenom: A potente anticâncer agente. **Asian pacific Journal of Cancer Prevention**, 13:4855-4860, 2012.

JANCARIK, J.; KIM, S.H. Sparse matrix sampling: a screening method for the crystallization of proteins. **J. Appl. Crystallogr.**, 24:409-11, 1991.

KINI, R.M. Excitement ahead: Structure, Function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, 42:827-840, 2003.

KOH, D.C.I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, 63:3030-3041, 2006.

KUNIYOSHI, A.K.; KODAMA, R.T.; CAJADO-CARVALHO, D.; IWAI, L.K.; KITANO, E.; SILVA, C.C.F.; DUZZI, B.; SILVA, W.D.; PORTARO, F.C. Experimental antivenom against serine proteases from the *Bothrops jararaca* venom obtained in mice, and its comparison with the antithrombotic serum from the Butantan Institute. **Toxicon**, 169:59-67, 2019.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, 227:680-85, 1970.

LATTIG, J.; BOHL, M.; FISCHER, P.; TISCHER, S.; TIETBOHL, C.; MENSCHIKOWSKI, M.; GUTZEIT, H.O.; METZ, P.; PISABARRO, M.T. Mechanism of inhibition of human secretory phospholipase A<sub>2</sub> by flavonoids: rationale for lead design. **J Comput Aided Mol Des**, 21:473-83, 2007.

LEWIN, M., SAMUEL, S., MERKEL, J., BICKLER, P. Varespladib (LY315920) appears to be a potent, broad-spectrum, inhibitor of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> and a possible pre-referral treatment for envenomation. **Toxins** 8 (9), E248, 2016.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M. Phospholipases A<sub>2</sub> from viperidae snake venoms: how do they induce skeletal muscle damage? **Acta Chim. Slov.** 58:647-659, 2011.

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

MARKLAND, F.S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36:1749-1800,1998.

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

McPHERSON, A. Crystallization of biological macromolecules. **Malabar: Krieger Publishing Company**, 371p, 1989.

MELÉNDEZ-MARTÍNEZ, D.; MUÑOZ, J. M.; BARRAZA-GARZA, G.; CRUZ-PERÉZ, M. S.; GATICA-COLIMA, A.; ALVAREZ-PARRILLA, E.; PLENGE-TELLECHEA, L. F. Rattlesnake

*Crotalus molossus nigrescens* venom induces oxidative stress on human erythrocytes. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 23:p.24, 2017.

MISHRA, L.C.; SINGH, B.B.; DAGENAIS, S. Scientific basis for the therapeutic use of *Withania somnifera* (ashwagandha): a review. **Altern Med Rev**, 5:334-46, 2000.

NUNES, D.C.O.; RODRIGUES, R.S.; LUCENA, M.N.; COLOGNA, C.T.; OLIVEIRA, A.C.S.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; ARANTES, E.C.; TEIXEIRA, D.N.S.; UEIRA- VIEIRA, C.; RODRIGUES, V.M. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. - C Toxicol. Pharmacol**, 154:226-233, 2011.

OHLER, M.; GEORGIEVA, D.; SEIFERT, J. *et al.* The venomics of bothrops alternates is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **Jornal of Proteome Research**, 9:2422 – 2437, 2010.

OMS – Organização Mundial da Saúde, Snakebite envenoming. Disponível em: <http://www.who.int/snakebites/disease/en/>, 2019a (acesso em: 23 de janeiro de 2020).

OMS – Organização Mundial da Saúde, Neglected tropical diseases. Disponível em: [http://www.who.int/neglected\\_diseases/en/](http://www.who.int/neglected_diseases/en/), 2019b (acesso em: 23 de janeiro de 2020).

OSLUND, R.C.; CERMAK, N.; GELB, M.H. Highly specific and broadly potent inhibitors of mammalian secreted phospholipases A<sub>2</sub>. **J Med Chem**, 51:4708-14, 2008.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from snake venom. **Toxicon**, 42:841-54, 2003.

OWNBY, C.L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. **Toxicon** 37:411-445, 1999.

PAL, S.K.; GOMES, A.; DASGUPTA, S.C. Snake venom as therapeutic agentes: From toxin to drug development. **Indian Journal of Experimental Biology**, 2002.

PENNINGTON, S.R.; DUNN. M.J. Proteomics: from protein sequence to function. **New York: Springer-Verlag e BIOS scientific Plubishers**, 2001.

PEREIRA, N.B. Lesões necróticas determinadas pela Urutu. **Revista de Cirurgia de São Paulo**, 5: 477-490, 1940.

- PETERSEN, M.; SIMMONDS, M. S. J. Molecules of interest - Rosmarinic acid. *Phytochemistry*, 62:121-125, 2003.
- PONCE-SOTO, L.A.; MARTINS-DE-SOUZA, D.; MARANGONI, S. Neurotoxic, Myotoxic and Cytolytic Activities of the New Basic PLA<sub>2</sub> Isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II Isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) Snake Venom. **The Protein Journal**, 29:103-113, 2010.
- QUEIROZ, M.; MAMEDE, C.; FONSECA, K., *et al.* Biological characterization of a myotoxin phospholipase A<sub>2</sub> homologue purified from the venom of the snake *Bothrops moojeni*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, 17:49-58, 2011.
- RAMOS, O.H.P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S. Snake venom metalloproteases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 142:328-346, 2006.
- ROCHA, M.M.T.; FURTADO, M.F.D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron e Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, 22:383-393, 2005.
- ROTHER, R.P.; BELL, L.; HILLMEN, P.; GLADWIN, M.T. The clinical sequelae of intravascular hemolysis and extracellular plasma hemoglobin. **Journal of the American Medical Association**, 293:1653-1662, 2005.
- SALVADOR, G. H. M.; FERNANDES, C. A. H.; MAGRO, A. J.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; CAVALCANTE, W. L. G.; FERNANDEZ, R. M.; GALLACCI, M.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, C. L. P.; FONTES, M. R. M. Structural and Phylogenetic Studies with MjTX-I Reveal a Multi-Oligomeric Toxin - a Novel Feature in Lys49-PLA<sub>2</sub>s Protein Class. **PLoS ONE**, 8 (4), 2013.
- SALVADOR, G.H.M., GOMES, A.A.S., BRYAN-QUIROS, W., FERNÁNDEZ, J., LEWIN, M.R., GUTIÉRREZ, J.M., LOMONTE, B., FONTES, M.R.M. Structural basis for phospholipase A<sub>2</sub>-like toxin inhibition by the synthetic compound Varespladib (LY315920). **Sci. Rep.** 9:1–13, 2019.
- SANTOS-FILHO, N.A.; SILVEIRA, L.B.; OLIVEIRA, C.Z.; BERNARDES, C.P.; MENALDO, D.L.; FULY, A.L.; ARANTES, E.C.; SAMPAIO, S.V.; MAMEDE, C.C.N.; BELETTI, M.E.; DE OLIVEIRA, F.; SOARES, A.M. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I<sub>2</sub>

inductor phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, 52:908-917, 2008.

SANTOS, C. J. C. Análise espacial da ocorrência de acidentes ofídicos no Brasil e seus determinantes ambientais e socioeconômicos. Dissertação (Mestrado) – Curso de Pós-Graduação e Pesquisa da Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiânia, 2018.

SCOTT, D.L.; OTWINOWSKI, Z.; GELB, M.H.; SIGLER, P.B. Crystal structure of bee venom phospholipase A<sub>2</sub> in a complex with a transition state analogue. **Science**, 250:1563-1566, 1990a.

SCOTT, D.L. Phospholipase A<sub>2</sub>: structure and catalytic properties. In: Kini, R.M. (Ed.) Venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: structure, function and mechanism. **Chichester: John Wiley & Sons Ltd.**; p321-352, 1997.

SETÚBAL, S.S.; PONTES, A.S.; FURTADO, J.L.; XAVIER, C.V.; SILVA, F.L.; KAYANO, A.M.; IZIDORO, L.F.M.; SOARES, A.M.; CALDERON, L.A.; STÁBELI, R.G.; ZULIANI, J.P. Action of two phospholipases A<sub>2</sub> purified from *Bothrops alternatus* snake venom on macrophages. **Biochemistry**, 78:194-203, 2013.

SHARMA, R.D.; KATKAR, M.S.; PAUL, M.; NAVEEN-KUMAR, S.K.; SWETHAKUMAR, B. HEMSHEKHAR, M. GIRISH, K.S.; KEMPARAJU, K. Oxidative stress-induced methemoglobinemia is the silent killer during snakebite: a novel and strategic neutralization by melatonin. **J. Pineal Res.** 59:240-254, 2015.

SILVA, A.; ISBISTER, G.K. Current research into snake antivenoms, their mechanisms of action and applications. **Biochem Soc Trans**, 48:537-546, 2020.

SILVEIRA L. B. Caracterização estrutural e funcional de uma nova fosfolipase A<sub>2</sub> ácida de *Bothrops moojeni*. Tese de doutorado apresentada ao programa de pós-graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto / USP, 2011.

SINGH, R.K.; ETHAYATHULLA, A.S.; JABEEN, T.; SHARMA, S.; KAUR, P.; SINGH, T. P. Aspirin induces its anti-inflammatory effects through its specific binding to phospholipase A<sub>2</sub>: crystal structure of the complex formed between phospholipase A<sub>2</sub> and aspirin at 1.9 angstroms resolution. **J Drug Target**, 13:113-9, 2005.

SINGH, R.K.; VIKRAM, P.; MAKKER, J.; JABEEN, T.; SHARMA, S.; DEY, S.; KAUR, P.; SRINIVASAN, A.; SINGH, T.P. Design of specific peptide inhibitors for group I phospholipase A<sub>2</sub>: Structure of a complex formed between phospholipase A<sub>2</sub> from *Naja naja sagittifera* (group I)

and a designed peptide inhibitor Val-Ala-Phe-Arg-Ser (VAFRS) at 1.9 Å resolution reveals unique features. **Biochemistry**, 42:11701-6, 2003.

SOARES, A.M.; FONTES, M.R.M.; GIGLIO, J.R. Phospholipases A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure-function relationship. **Curr Org Chem.**, 8:1677-1690, 2004a.

SOERENSEN, B. Acidentes por Animais Peçonhentos: Reconhecimento, Clínica e Tratamento. São Paulo: **Atheneu**, 2000.

SUNITHA, K. ; HEMSHEKHAR, M. ; THUSHARA, R.M. ; SANTHOSH, M. S. ; SUNDARAM, M. S. ; KEMPARAJU, K. ; GIRISH, K.S. Inflammation and oxidative stress in viper bite: an insight within and beyond. **Toxicon**, 98:89-97, 2015.

SWENSON, S.; MARKLAND JR, F.S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, 45:1021-1039, 2005.

TEUSCHER, E. Medicinal Spices: A handbook of culinary herbs, spices, spice mixtures and their essential oils. **Triebes: Medpharm**, p. 324-327, 2006.

WARRELL, D. A. The global problem of snakebite: Its prevention and treatment. In: Recent advances in toxinology research. **Singapore: National University of Singapore**, p.121-153, 1992.

WILLIAMS, D.; GUTIERREZ J.M.; HARRISON R.; WARRELL D.A.; WHITE J.; WINKEL K.D.; GOPALAKRISHNAKONE P. The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snakebite. **Lancet**, 375:89-91, 2010.

WILLIAMS, S.S.; WIJESINGHE, C.A.; JAYAMANNE, S.F., *et al.* Delayed psychological morbidity associated with snakebite envenoming. **PLoS Negl Trop Dis**, 5: e1255, 2011.

WILLIAMS, H.F.; HAYTER, P.; RAVISHANKAR, D.; BAINES, A.; LAYFIELD, H.J.; CROUCHER, L.; WARK, C.; BICKNELL, A.B.; TRIM, S.; VAIYAPURI, S. Impact of *Naja nigricollis* Venom on the Production of Methaemoglobin. **Toxins**, v. 10:p.539, 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **List of neglected tropical diseases**. 2014. Disponível em: < [https://www.who.int/neglected\\_diseases/diseases/en/](https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/)>. Acesso em 22 de março de 2020.

ZAQUEO, K.D. Purificação e caracterização parcial de uma serino protease inédita do veneno da serpente *Bothrops pirajai*. Dissertação (Mestrado) - Curso de Biologia Experimental, Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2011.

YOUNGMAN, N.J.; WALKER, A.; NAUDE, A.; COSTER, K.; SUNDMAN, E.; FRY, B.G.  
Varespladib (LY315920) neutralizes phospholipase A<sub>2</sub> mediated prothrombinase-inhibition  
induced by *Bitis* snake venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, 236:1-6, 2020.

## **ANEXO 01**

Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UFPB e UDCDB

(20/01) 2011-01

**ACORDO DE COOPERAÇÃO TÉCNICA E CIENTÍFICA QUE ENTRE SI CELEBRAM, DE UM LADO, A UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO - UCDB E, DE OUTRO, UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA - UFPB**

A **UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO**, mantida pela **MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO**, pessoa jurídica de direito privado, associação civil sem fins lucrativos, inscrita no CNPJ/MF sob nº 03.226.149/0015-87, estabelecida na Av. Tamandaré, 6.000, em Campo Grande/MS, doravante designada simplesmente **UCDB**, neste ato representada por seu Magnífico Reitor **Pe. José Marinoni**, portador do RG nº 219039 SSP/MS, e do CPF nº 127554511-49, e de outro lado, a **UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA**, inscrita no CNPJ/MF sob o nº 24.098.477/0001-10, sediada na Cidade Universitária, bairro Castelo Branco, em João Pessoa/PB, doravante designada simplesmente **CPr-Lab - UFPB**, neste ato representada por sua Magnífica Reitora professora **Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**, portadora da Cédula de Identidade nº 394.612 SSP-PB, CPF nº 323.157.164-20, domiciliada na cidade de João Pessoa/PB, resolvem celebrar o presente Acordo de Cooperação Técnica e Científica, regido pelas cláusulas e condições seguintes:

**CLÁUSULA PRIMEIRA - DO OBJETO**

O presente Acordo objetiva a conjunção de esforços entre as partes, mediante utilização de recursos técnicos e/ou materiais disponíveis, para a implementação de atividades de aprofundamento do conhecimento técnico-científico de qualificação e capacitação voltadas à formação de recursos humanos e obtenção de resultados científicos na área de Biologia Molecular Estrutural com a utilização de toxinas isoladas de venenos de serpentes e/ou venenos brutos.

**SUBCLÁUSULA PRIMEIRA** - A implementação dos objetivos deste Acordo será realizada em conformidade com as descrições constantes do documento anexo denominado **Plano de Trabalho**, o qual, uma vez rubricado pelas partes, passa a integrar o presente instrumento, independentemente de transcrição sob a forma de termos aditivos.

**SUBCLÁUSULA SEGUNDA** - As atividades de aprofundamento do conhecimento técnico-científico de qualificação e capacitação incluem a participação em cursos, seminários, congressos, palestras, e outras atividades inerentes e correlatas à área de Biologia Molecular Estrutural.

**CLÁUSULA SEGUNDA - DO LOCAL DE EXECUÇÃO**

As atividades de qualificação e capacitação, bem como outras atividades inerentes e necessárias para a consecução do objeto deste instrumento, poderão ser executadas nas áreas físicas, complexos educacionais e de treinamentos estabelecidos em ambas às instituições.



### **CLÁUSULA TERCEIRA - DA COORDENAÇÃO**

A Coordenação do objeto deste Acordo ficará, por parte da UFPB, sob a responsabilidade da Professora **DANIELA PRISCILA MARCHI SALVADOR**, Matrícula SIAPE 1775477, Coordenadora do Laboratório de Cristalografia de Proteínas, CPr-Lab do Departamento de Biologia Molecular do Centro de Ciências Exatas e da Natureza da UFPB, a qual será responsável por todas as ocorrências relacionadas à sua execução, determinando o que for necessário para a regularização das faltas ou incorreções observadas.

### **CLÁUSULA QUARTA - DAS OBRIGAÇÕES**

Visando à consecução dos objetivos propostos, além das demais obrigações constantes desse instrumento, as partes comprometem-se especificamente a:

#### **I - OBRIGAÇÕES DA UCDB:**

- a) Permitir que técnicos, pesquisadores (docentes) e discentes integrantes do seu quadro de pessoal desenvolvam ações voltadas ao desenvolvimento dos objetivos propostos com efetivação do presente Acordo;
- b) Possibilitar acesso à infraestrutura disponível no *campus* necessárias para execução dos objetivos propostos no presente Acordo;
- c) Disponibilizar e ceder material biológico (veneno bruto e/ou toxinas isoladas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*) para realização de experimentos biológicos propostos nos objetivos do presente Acordo;
- d) Captar, capacitar e qualificar recursos humanos para executar ações (extração de peçonhas de serpentes) relacionadas ao cumprimento dos objetivos propostos no presente Acordo;

#### **II - OBRIGAÇÕES DO UFPB, através do CPr-Lab:**

- a) Disponibilizar discentes integrantes de projetos de pesquisa coordenados pela Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> **DANIELA PRISCILA MARCHI SALVADOR** e/ou por docentes colaboradores para desenvolverem ações voltadas à execução dos objetivos propostos no presente acordo e seus termos aditivos;
- b) Disponibilizar pesquisadores (docentes), mediante autorização do setor de lotação competente e respeitando a compatibilidade entre a carga horária acadêmica e as horas dispensadas as atividades abrigadas por este acordo;
- c) Permitir acesso à infraestrutura e aos materiais consumíveis disponíveis no Laboratório de Cristalografia de Proteínas - CPr-Lab ou em demais laboratórios parceiros para proporcionar condições necessárias para executar os objetivos propostos no presente Acordo;
- d) Realizar experimentos de avaliação de efeitos biológicos de venenos brutos e de suas respectivas frações proteicas isolados de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* na ausência e/ou na presença inibidores naturais e/ou



- sintéticos bem como elucidar e analisar estruturas oligoméricas de proteicas isoladas de peçonhas de serpentes por cristalografia de raios X;
- e) Realizar estudos computacionais (topológicos, *docking*, de dinâmica molecular e filogenéticos) para avaliar as características pertinentes às PLA<sub>2</sub>s isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por estas enzimas;
  - f) Captar e capacitar e qualificar recursos humanos para realização de ensaios biológicos e caracterização biofísicoquimicamente dos venenos brutos e as frações isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*;
  - g) Publicar os resultados obtidos no decorrer da execução da presente parceria em eventos científicos e/ou na forma de artigos científicos, relatórios de iniciação científica, dissertações de mestrado e teses de doutorado.

#### **CLÁUSULA QUINTA - DOS RECURSOS HUMANOS**

Os recursos humanos utilizados pelas partes convenientes na execução deste Acordo, na condição de empregado, autônomo, empreiteiro, ou a qualquer outro título, nenhuma vinculação ou direito terá em relação à outra parte, ficando a cargo exclusivo da parte conveniente a integral responsabilidade no que se referem a todos os direitos das pessoas que contratar, mormente os trabalhistas e previdenciários, inexistindo qualquer solidariedade entre as partes neste sentido.

#### **CLÁUSULA SEXTA - DA TRANSFERÊNCIA DE RECURSOS**

Para execução do presente Acordo não haverá transferência ou repasse de recursos financeiros de quaisquer naturezas entre as Instituições convenientes.

**SUBCLÁUSULA ÚNICA** - Havendo a necessidade de transferência de recursos as partes deverão celebrar instrumento específico para tal finalidade.

#### **CLÁUSULA SÉTIMA - DA VIGÊNCIA**

O presente instrumento terá vigência de 5 (cinco) anos, a contar da data de sua assinatura.

**SUBCLÁUSULA ÚNICA** - O presente Acordo poderá, a qualquer tempo, ser denunciado, mediante aviso prévio de 45 (quarenta e cinco) dias.

#### **CLÁUSULA OITAVA - DA RESCISÃO**

Por decisão, em comum acordo por ambos os convenientes, o presente poderá ser rescindido ou, ainda, o mesmo poderá ser anulado por descumprimento de quaisquer de suas cláusulas ou condições por um dos contratados e, a parte prejudicada poderá rescindir o presente Acordo, mediante simples comunicação, escrita e fundamentada, à outra, respondendo a parte inadimplente pelas perdas

m  


e danos decorrentes, ressalvadas as hipóteses de caso fortuito ou de força maior, devidamente caracterizadas.

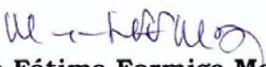
**CLÁUSULA NONA – DO FORO**

Para a solução de quaisquer controvérsias porventura oriundas da execução deste Acordo, em relação às quais não tenha havido entendimento amigável, as partes elegem o Foro da Justiça Federal da Cidade de João Pessoa-PB, com renúncia expressa a qualquer outro, por mais privilegiado que seja.

Estando assim justas e contratadas, firmam o presente instrumento em 03 (três) vias de igual teor e forma, na presença das testemunhas abaixo nomeadas e subscritas.

Campo Grande/MS, 21 de outubro de 2014.

  
**Pe. José Marinoni**  
Reitor da Universidade Católica Dom Bosco

  
**Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz**  
Reitora da Universidade Federal da Paraíba

Testemunhas:

1. \_\_\_\_\_

2. \_\_\_\_\_

**PLANO DE TRABALHO**  
**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB**

**I - IDENTIFICAÇÃO**

<b>CONCEDENTE</b>	<b>CNPJ</b>
UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO	03.226.149/0015-87

<b>RESPONSÁVEL</b>	<b>CPF</b>	<b>RG</b>
JOSÉ MARINONI	127.554.511-49	219.039 SSP/MS

---

<b>CONVENENTE</b>	<b>CNPJ</b>
UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAÍBA	24.098.477/0001-10

<b>ENDEREÇO</b>	<b>CEP</b>
CIDADE UNIVERSITARIA, CASTELO BRANCO, JOÃO PESSOA/PB	58051-900

<b>ESFERA ADMINISTRATIVA</b>
Administração Pública Federal

<b>RAMO DE ATUAÇÃO</b>
EDUCAÇÃO SUPERIOR

<b>REPRESENTANTE LEGAL</b>	<b>CPF</b>	<b>RG</b>
Margareth de Fátima Formiga Melo Diniz	323.157.164-20	394.612 SSP-PB

<b>OBJETO</b>
Execução de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> .





**PLANO DE TRABALHO**  
**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB**

**II - OBJETO/JUSTIFICATIVA**

**OBJETO**

*Execução de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus.*

**JUSTIFICATIVA**

O presente convênio possibilitará a extração de venenos de serpentes para realização de estudos bioquímicos, tóxicos, farmacológicos e estruturais com venenos brutos e/ou toxinas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros Bothrops e Crotalus na tentativa de melhor compreender o(s) possível(eis) mecanismo(s) de ação(ões) destas enzimas.



PLANO DE TRABALHO  
Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPE

**III - METAS**

Meta	Descrição das metas e etapas	Data Inicial	Data Final
1	Extrair e caracterizar biologicamente os venenos brutos de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> ;	outubro/2014	outubro/2019
2	Isolar frações proteicas que compõem peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> ;	outubro/2014	outubro/2019
3	Caracterizar efeitos tóxicos, bioquímicos e farmacológicos das frações proteicas inéditas isoladas no desenvolvimento deste projeto e/ou frações proteicas isoladas na presença de inibidores naturais e/ou sintéticos através de ensaios biológicos;	outubro/2014	outubro/2019
4	Cristalizar e/ou co-cristalizar (na presença de inibidores naturais e/ou sintéticos) frações proteicas isoladas de peçonhas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> isoladas no decorrer do presente projeto e/ou disponibilizadas por colaboradores;	janeiro/2015	outubro/2019
5	Coletar dados de difração de raios X dos cristais obtidos nas estações experimentais MX1 ou MX2 do Laboratório Nacional de Luz Sincrotron, LNLS/Campinas-SP;	março/2015	outubro/2019
6	Elucidar e analisar a(s) estrutura(s) tridimensional(is) das PLA2s cristalizadas que geraram bons conjuntos de dados de difração de raios X;	abril/2015	outubro/2019
7	Determinar regiões de reconhecimento de PLA2s isoladas de serpentes dos gêneros <i>Bothrops</i> e <i>Crotalus</i> frente aos soros antiofídicos anticrotálico e antibotrópico;	junho/2015	outubro/2019
8	Analisar as regiões imunogênicas das diferentes PLA2s botrópicas e crotálicas que reagiram com os diferentes soros antiofídicos e realizar um estudo comparativo entre as PLA2s isoladas de venenos de serpentes da família Viperidae;	junho/2015	outubro/2019
9	Envolver estudantes de graduação e pós-graduação a fim de inseri-los na comunidade científica e repassar a metodologia experimental utilizada para obtenção de estruturas oligoméricas de macromoléculas biológicas.	outubro/2014	outubro/2019
10	Realizar estudos computacionais (topológicos, docking, de dinâmica molecular e filogenéticos) para avaliar as características pertinentes às PLA2s isoladas de peçonhas de serpentes e sugerir possíveis moléculas inibidoras das atividades tóxicas e farmacológicas desencadeadas por estas enzimas;	fevereiro/2015	outubro/2019
11	Divulgar os resultados parciais e/ou completos obtidos no decorrer da execução da presente parceria em congressos científicos e/ou na forma de artigos científicos, relatórios de iniciação científica, dissertações de mestrado e teses de doutorado.	outubro/2014	outubro/2019

**PLANO DE TRABALHO**  
**Anexo ao Acordo de Cooperação Técnica e Científica entre a UCDB e a UFPB**

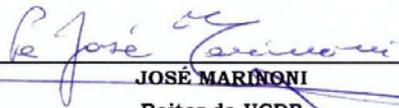
**IV - DECLARAÇÃO DO CONVENIENTE E APROVAÇÃO DO CONCEDENTE**

**Declaração**

Na qualidade de representante legal, declaro para fins de prova junto a Universidade Federal da Paraíba, para os efeitos e sob penas da lei, que inexistem quaisquer débitos em mora ou situação de inadimplência com o Tesouro Nacional ou qualquer órgão ou entidade da Administração Pública Federal, Direta e Indireta, que impeça a celebração do presente Acordo de Cooperação Técnica.

Pede Deferimento,

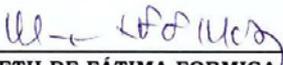
Campo Grande - MS, 21 de outubro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
**JOSE MARINONI**  
Reitor da UCDB

**Aprovação**

Aprovo,

João Pessoa - PB, 21 de outubro de 2014.

  
\_\_\_\_\_  
**MARGARETH DE FÁTIMA FORMIGA MELO DINIZ**  
Reitora da UFPB

## **ANEXO 02**

Termo de Procedência de Venenos Ofídicos



UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Valorizando talentos



Missão Salesiana de Mato Grosso  
Universidade Católica Dom Bosco  
Instituição Salesiana de Educação Superior  
Biotério MSMT – UCDB /  $\beta$ ioToxX



Campo Grande-MS, 20 de Maio de 2014.

#### TERMO DE PROCEDÊNCIA

Seguem 03 frascos contendo 04 gramas cada um de veneno cristalizado de serpentes do gênero *Bothrops moojeni*, *Bothrops alternatus* e *Crotalus durissus* código/nº: B. m/s8-0021, oriundas do plantel do Biotério/UCDB com o número de registro 718.682, junto ao Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis - IBAMA, localizado no campus da **Universidade Católica Dom Bosco**, situada na Av. Tamandaré, 6000, Bairro Jd. Seminário, CEP 79117-900, Cx.P. 100 em Campo Grande – Mato Grosso do Sul.

Paula Helena Santa Rita  
Biotério/UCDB

Paula Helena Santa Rita  
Médica Veterinária  
CRMV-MS 3383  
Biotério - UCDB

MISSÃO SALESIANA DE MATO GROSSO - UNIVERSIDADE CATÓLICA DOM BOSCO  
Av. Tamandaré, 6000 - Jardim Seminário - CEP: 79117-900 - CAMPO GRANDE - MS - BRASIL  
CNPJ/MF: 03.226.149/0015-87 - Fone: 55 67 3312-3300 - Fax: 55 67 3312-3301 - www.ucdb.br

### **ANEXO 03**

Certificado de Apresentação para Apreciação Ética (CAAE)



## PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Titulo da Pesquisa:** Avaliação das atividades oxidante, catalítica e coagulante de uma fosfolipase A2 isolada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*

**Pesquisador:** Micaela de Melo Cordeiro Eulálio

**Área Temática:**

**Versão:** 2

**CAAE:** 39037620.1.0000.8069

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DA PARAIBA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 4.452.946

#### **Apresentação do Projeto:**

Pesquisa acadêmica, vinculada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Molecular da Universidade Federal da Paraíba da pesquisadora MICAELA DE MELO CORDEIRO EULÁLIO, sob a orientação da Profª Drª Daniela Priscila Marchi Salvador e do Dr Guilherme Henrique Marchi Salvador. Trata-se de uma pesquisa de caráter experimental, que será realizada utilizando sangue total humano, concentrado de hemácias e plasma humano citratado, coletado por profissionais biomédicos ou outros profissionais capacitados e doados por voluntários estudantes dos cursos de graduação e pós-graduação da UFPB, que não tenham feito uso de medicamento nos dez dias anteriores a coleta e estejam em jejum de no mínimo 4 horas. A ação catalítica da toxina será avaliada utilizando como substrato eritrócitos e gema de ovo. Serão avaliados três potenciais inibidores: varespladib, suramina e ácido rosmarínico. O potencial efeito oxidante da PLA2 sobre soluções de hemoglobinas (SolHb) será realizado utilizando leitor de microplacas (Multiskan GO), nos comprimentos de ondas de 540 e 630 nm. Para avaliar a atividade coagulante, leituras serão feitas com a utilização do equipamento Coagmaster 2.0 (Wama).

#### **Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

Avaliar os efeitos: coagulante, oxidativo e catalítico de uma fosfolipase A2 isolada da peçonha

**Endereço:** Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1

**Bairro:** CASTELO BRANCO

**CEP:** 58.051-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3216-7308

**E-mail:** comitedeetica@ccm.ufpb.br



Continuação do Parecer: 4.452.946

bruta de *Bothrops alternatus*.

Objetivo Secundário:

- Avaliar atividade coagulante de uma fosfolipase A2 isolada da peçonha bruta de *Bothrops alternatus*;
- Avaliar o efeito oxidante da fosfolipase A2 sobre o sangue total e um concentrado de hemácias;
- Comparar o potencial oxidativo da fosfolipase A2 isolada com o da peçonha bruta;
- Avaliar a atividade catalítica da fosfolipase A2 e o potencial de inibição de três candidatos a inibidores: varespladib, ácido rosmarínico e suramina.

#### **Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Riscos:

Essa pesquisa pode oferecer risco mínimo previsível ao voluntário, visto que será realizada punção venosa periférica, dessa forma o paciente pode sentir um leve desconforto e dor na coleta, risco esse que será minimizado uma vez que o procedimento será realizado por profissional biomédico ou outro profissional habilitado para tal atividade. Além disso, o procedimento de coleta obedecerá todas as normas de biossegurança em vigência.

Benefícios:

Esta pesquisa pode trazer benefícios como a identificação de um potencial inibidor da fosfolipase A2 de *Bothrops alternatus*, além de conhecer, *in vitro*, a alteração das características hemostáticas promovidas pela PLA2.

#### **Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

É uma pesquisa relevante, o projeto bem elaborado e os pesquisadores atenderam as recomendações solicitadas pelo CEP.

#### **Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Foram devidamente apresentados Projeto completo, TCLE, TCLE com alterações destacadas, carta resposta, folha de rosto, termo de anuência e documento do pesquisador responsável, possibilitando uma adequada avaliação no que se refere aos aspectos éticos da pesquisa em tela.

#### **Recomendações:**

- Manter a metodologia aprovada PELO CEP-CCM.
- Apresentar os relatórios parcial e final, via Plataforma Brasil, no ícone notificações.
- Informar ao CEP-CCM, por meio de Emenda/Notificação a inclusão de novos membros/equipe de pesquisa, via plataforma Brasil.
- Caso ocorram intercorrências durante ou após o desenvolvimento da pesquisa, a exemplo de

**Endereço:** Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1

**Bairro:** CASTELO BRANCO

**CEP:** 58.051-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3216-7308

**E-mail:** comitedeetica@ccm.ufpb.br



Continuação do Parecer: 4.452.946

alteração de título, mudança de local da pesquisa, população envolvida, entre outras, o (a) pesquisador (a) responsável deverá solicitar a este CEP, via Plataforma Brasil, aprovação de tais alterações, ou buscar devidas orientações.

#### Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O presente projeto encontra-se devidamente instruído conforme o que preconiza a Resolução 466-12, do Conselho Nacional de Saúde - Ministério da Saúde. Desse modo, somos favoráveis à aprovação.

#### Considerações Finais a critério do CEP:

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências Médicas- CEP-CCM, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS nº 466 de 2012 e na Norma Operacional nº 001 de 2013 do CNS, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto.

Situação: Protocolo aprovado.

#### Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1636210.pdf	25/11/2020 11:33:58		Aceito
Outros	CARTA_RESPOSTA.doc	25/11/2020 11:31:59	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_ALTERACOES_DESTACADAS.doc	25/11/2020 11:30:22	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE.doc	25/11/2020 11:25:20	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto_DocAssinado.pdf	25/11/2020 11:23:03	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETO_COMITE_DE_ETICA.pdf	29/09/2020 21:43:51	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PESQUISADOR_PARTICIPANTE1.pdf	29/09/2020 21:41:42	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito
Declaração de Pesquisadores	PESQUISADOR_PARTICIPANTE2.pdf	29/09/2020 21:40:12	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito

**Endereço:** Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1

**Bairro:** CASTELO BRANCO

**CEP:** 58.051-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3216-7308

**E-mail:** comitedeetica@ccm.ufpb.br



Continuação do Parecer: 4.452.946

Declaração de Pesquisadores	PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	29/09/2020 21:38:05	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	TERMO_DE_ANUENCIA.pdf	29/09/2020 21:34:57	Micaela de Melo Cordeiro Eulálio	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

JOAO PESSOA, 10 de Dezembro de 2020

---

**Assinado por:**  
**Cristina Wide Pissetti**  
**(Coordenador(a))**

**Endereço:** Centro de Ciências Médicas, 3º andar, Sala 14 - Cidade Universitária Campus 1

**Bairro:** CASTELO BRANCO

**CEP:** 58.051-900

**UF:** PB

**Município:** JOAO PESSOA

**Telefone:** (83)3216-7308

**E-mail:** comitedeetica@ccm.ufpb.br