



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão, purificação e avaliação da inibição da atividade fosfolipásica A₂ do inibidor recombinante rγCdcPLI de *Crotalus durissus collilineatus*

Marina Neves Gonçalves

Monografia apresentada à Coordenação do
Curso de Ciências Biológicas da Universidade
Federal de Uberlândia, para a obtenção do
grau de Bacharel em Ciências Biológicas

Orientador(a): Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Avila

Co-orientador(a): Dra. Sarah Natalie Cirilo Gimenes

Uberlândia - MG

Junho – 2019



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA

CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão, purificação e avaliação da inibição da atividade fosfolipásica A₂ do inibidor recombinante rγCdcPLI de *Crotalus durissus collilineatus*.

Homologado pela coordenação do Curso de
Ciências Biológicas em __/__/__

Coordenador(a) Profa. Dra. Celine de Melo

Uberlândia – MG

Junho – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA

INSTITUTO DE BIOLOGIA
CURSO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

Expressão, purificação e avaliação da inibição da atividade fosfolipásica A₂ do inibidor
recombinante rγCdcPLI de *Crotalus durissus collilineatus*

Marina Neves Gonçalves

Aprovado pela Banca Examinadora em: __/__/__ Nota: ____

Nome e assinatura do Presidente da Banca Examinadora

Uberlândia-MG

Junho- 2019

“Mesmo quando tudo parece desabar, cabe a mim decidir entre rir ou chorar, ir ou ficar, desistir ou lutar; porque descobri, no caminho incerto da vida, que o mais importante é o decidir”

(Cora Coralina)

Resumo

As enzimas PLA₂ de peçonhas de serpentes são muito investigadas dada a grande variedade de seus efeitos farmacológicos, como cardiotoxicidade, anticoagulação, neurotoxicidade, miotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, edema, convulsão, hipotensão e hemorragia. Desta forma questionamentos da resistência das próprias serpentes sobre o efeito deletério dessas enzimas em seu organismo, traz novas perspectivas sobre os inibidores em seu sangue. Os inibidores de PLA₂s oriundos do plasma de serpentes têm sido estudados demonstrando um alto potencial terapêutico em patologias nas quais as PLA₂s protagonizam em vários eventos moleculares. Assim, este trabalho teve como objetivo expressar, purificar e avaliar a inibição de um inibidor recombinante do tipo gama isolado do soro da serpente *Crotalus durissus collilinetatus* expresso em um sistema heterólogo utilizando *E. coli*. Para a sua purificação foi utilizado dois passos cromatográficos um de troca iônica utilizando a resina Q-Sepharose *Fast Flow* e o outro por afinidade pela afinidade em coluna NHS imobilizada com PLA₂ BnSP-7, sendo o grau de pureza avaliado por HPLC e Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE 12,5%). O perfil cromatográfico na troca iônica apresentou 6 frações (Q1 a Q6). As frações Q4 e Q5 apresentaram uma banda na faixa de 25kDa correspondente a massa molecular do inibidor nativo. O inibidor purificado apresenta um potencial inibitório sobre a atividade PLA₂ da peçonha de *B. pauloensis* semelhante ao inibidor nativo. No entanto novos estudos são necessários para se traçar um melhor perfil de inibição frente a diferentes classes de PLA₂s bem como diferentes atividades biológicas induzidas por estas, tais como a atividade miotóxica, edematogênica, inibição da agregação plaquetária, etc.

Palavras-chaves: Inibidores de PLA₂, inibidores recombinantes do tipo γ , Proteína Recombinante, *Crotalus durissus collineatus*, Fosfolipases A₂, Serpentes.

Abstract

The PLA₂ enzymes from snake venoms are widely investigated given the wide range of pharmacological effects such as cardiotoxicity, anticoagulation, neurotoxicity, myotoxicity, activation and/or inhibition of platelet aggregation, edema, seizure, hypotension and hemorrhaged. In these way questions of the resistance of the snakes themselves on the deleterious effect of these enzymes in their organism, brings new perspectives on the inhibitors in their blood. The Inhibitors of PLA₂s from snake plasma have been studied demonstrating a high therapeutic potential in pathologies in which PLA₂s play a role in various molecular events. Thus, this work aimed to express, purify and evaluate the inhibition of a gamma-type recombinant inhibitor isolated from the serum of *Crotalus durissus collilinetatus* expressed in a heterologous system using *E. coli*. For the purification, two ion exchange chromatographic steps were utilized using the Q-Sepharose Fast Flow resin and the other by affinity affinity for the NHS column affinity immobilized with BnSP-7 PLA₂, being the HPLC-evaluated grade and gel electrophoresis of polyacrylamide with denaturing agents (SDS-PAGE 12.5%). The chromatographic profile in the ionic exchange presented 6 fractions (Q1 to Q6). Fractions Q4 and Q5 presented a band in the range of 25kDa corresponding to the molecular mass of the native inhibitor. The purified inhibitor has an inhibitory potential on the PLA₂ activity of *B. pauloensis* venom similar to the native inhibitor. However, new studies are needed to establish a better inhibition profile against different classes of PLA₂s as well as different biological activities induced by them, such as myotoxic, edematogenic activity, inhibition of platelet aggregation, etc.

Keywords: PLA₂ inhibitors, recombinant γ -type inhibitors, Recombinant Protein, *Crotalus durissus collineatus*, Phospholipases A₂, Serpents

AGRADECIMENTOS

Começo os agradecimentos aos que me fortalecem todos os dias, meus pais, Silvana Arruda Neves Gonçalves e Gilberto Ozanam Neves Gonçalves. Sem vocês eu não teria chegado tão longe e persistido em busca da minha formação acadêmica. Agradeço por estarem presentes em todos os momentos de desespero (aos prantos), por buscarem todos os recursos possíveis e por nunca terem desistido de me fazer a pessoa mais amada no mundo inteiro.

Agradeço também as minhas famílias Neves e Gonçalves, por me mostrar exemplos a serem seguidos e nunca desistir em persistir. Em especial meu irmão Marcel que me mostrou superação e força de vencer todos os obstáculos sendo eles pessoais, materiais e profissionais.

Agradeço a oportunidade oferecida pela minha Orientadora Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Avila que mesmo sem me conhecer, me proporcionou a melhor experiência da minha vida, que me fez crescer tanto como mulher como uma futura profissional. À minha coorientadora Dra. Sarah Natalie Cirilo Gimenes que me ensinou com a maior paciência a rotina de um laboratório tanto presente e tanto quanto a distância, além de me confiar o seu projeto que desenvolveu com tanto amor e carinho.

Aos meus colegas de laboratório, Isabela, Marina, Lorena, Luana, Anna, Vitor, Tiago, Monica, Priscila, Fernanda, Joice, Tassia e outro mais, a mais sincera gratidão. Sem vocês eu não teria conseguido desenvolver o projeto e melhorar como pessoa.

À minha querida Marta Batalini que me fez enxergar a vida com mais esperança e amor, a nunca desistir dos meus sonhos impossíveis, a vê o presente com mais clareza e me manter sã nos meus dias mais sombrios.

Aos meus amigos de vida, Juliana, Kamilla, Andreza, Marcio, Tiago, Julia, Thais, Renner e Eduardo por me escutarem nos meus momentos de aflição, por me alegrarem quando estava sem motivação, por proporcionarem grandes honras e muito obrigada por persistirem estar na minha vida.

As minhas grandes amigas de longa data, Cindy e Giulyana, não tenho palavras para descrever a gratidão e o carinho que eu sinto por vocês! A nossa amizade só fortalece cada dia mais e vai ser para vida toda.

Agradeço a todos os meus professores e mestres, que passaram pela minha trajetória, ensinaram à sua maneira direito e deveres de um futuro profissional.

A todos que contribuíram na minha trajetória proporcionando momentos prazerosos e desagradáveis, a minha gratidão. Através dessas vivências que eu consegui chegar onde estou.

LISTA DE ABREVIATURAS

r γ CdcPLI – Inibidor recombinante do tipo gama de *Crotalus durissus collilineatus*

C. d. – *Crotalus durissus*

CRD - Domínio de reconhecimento de carboidratos

DMSO - Dimetilsulfóxido ou sulfóxido de dimetilo

E. coli- Escherichia coli

IPTG- Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside

mAU- Unidade de absorvância

NHS - N-hydroxysuccinimide

RPM - Rotações por minuto

SDS – Sodium Dodecyl Sulfate

SDS-PAGE- Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis

SINAN- Sistema de informação de agravos de notificação

PLA₂ – Fosfolipase A₂

sPLA₂- Fosfolipase A₂ secretória

cPLA₂- Fosfolipase A₂cistolítica

PLI – Inibidor de Fosfolipase

α PLI – Inibidor de Fosfolipase A₂ da classe alfa

β PLI- Inibidor de Fosfolipase A₂ da classe beta

γ PLI - Inibidor de Fosfolipase A₂ da classe gama

TEMED- Tetramethylethylenediamine

TRIS- Tris(hidroximetil)aminometano

UFU- Universidade Federal de Uberlandia

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Imagens mostrando características comuns pertencentes a *Crotalus durissus sp.*

Figura 2- Mapa de distribuição das subespécies de *Crotalus durissus* no território brasileiro.

Figura 3- Espécimes da subespécie *Crotalus durissus collilineatus*

Figura 4- Sítio de hidrólise de todas as classes de fosfolipases.

Figura 5- Representação esquemática do enovelamento de um monômero de PLA₂

Figura 6 -Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes da expressão do Inibidor γ CdcPLI e o seu sobrenadante ao final do protocolo de lise.

Figura 7 - Perfis cromatográficos obtidos através de dois métodos de purificação e eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes das frações obtidas.

Figura 8 - Inibição da atividade fosfolipásica A₂ pelo método potênciométrico utilizando como substrato uma emulsão de gema de ovo na presença de deoxicolato e cloreto de cálcio.

Sumário

Resumo

Abstract

Lista de abreviaturas e siglas

Lista de figuras

1. Introdução.....	12
1.1 Serpentes e Ofidismo.....	12
1.2 Peçonhas Crotalica.....	15
1.3 Classificação e características estruturais e funcionais das PLA ₂ s.....	17
1.4 Inibidores de fosfolipases A ₂	20
1.5 Expressão Heterologa.....	21
2. Objetivos.....	22
2.1 Objetivo geral.....	22
2.2 Objetivos específicos.....	22
3. Materiais e Métodos.....	23
3.1 Reagentes.....	23
3.2 Obtenção da Peçonha.....	23
3.3 Obtenção do gene sintético do inibidor <i>rγCdcPLI</i>	23
3.4 Dosagem Proteica.....	23
3.5 Expressão do Inibidor <i>rγCdcPLI</i>	24
3.5.1 Preparação do pré-inoculo.....	24
3.5.2 Preparação do inoculo e indução da expressão do inibidor <i>rγCdcPLI</i>	24
3.6 Purificação pelo método cromatográfico.....	25
3.6.1 Cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose <i>fast flow</i>	25
3.6.2 Cromatografia de afinidade NHS.....	25
3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)	25
3.8 Atividade Fosfolipásica.....	26
3.9 Inibição da atividade fosfolipásica pelo <i>rγCdcPLI</i>	26
4. Resultados.....	27
4.1 Obtenção do <i>rγCdcPLI</i>	27
4.2 Purificação do <i>rγCdcPLI</i>	28
4.3 Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de <i>Bothrops pauloensis</i> pelo <i>rγCdcPLI</i>	31

5. Discussão.....	32
6. Conclusão.....	35
7. Referências.....	36

1.Introdução

1.1Serpentes e ofidismo

As serpentes pertencem à classe Reptília que dispõe atualmente de 10.700 espécies de répteis reconhecidas no mundo (UETZ&HOŠEK 2018), sendo dividida nas Ordens Testudines (inclui todas as tartarugas), Rhyncocephalia (duas espécies de tuatara), Crocodylia (os jacarés, crocodilos, aligátors e o gavial) e Squamata (todas as serpentes, cobras-de-duas-cabeças e lagartos) (SLAVENKO, ET AL. 2019).

A Ordem Squamata possui uma subordem de grande importância para a saúde pública, a subordem Ophidia. De acordo com Costa & Bérnilis (2018), no Brasil foram identificadas 442 espécies de serpentes, na qual aproximadamente 40% são endêmicas do nosso território. Outro estudo realizado entre os anos de 1758 e 2012 foram registrou cerca de 3783 espécies de serpentes (3509 existentes e 274 espécies extintas), destas aproximadamente 689 eram peçonhentas (WALLACH ET AL, 2014).

As serpentes são classificadas em nove famílias, das quais apenas duas são consideradas peçonhentas. A primeira família é a Elapidae, que é representada pelas corais-verdadeiras do gênero *Micrurus e Leptomicrurus* e a segunda família é a Viperidae, representada pelos gêneros *Bothrops, Crotalus e Lachesis*, conhecidas como jararacas, cascavéis e surucucus (PYRON ET AL., 2013).

As espécies da família Viperidae consideradas peçonhentas, possuem especializações morfológicas que através de um processo de evolução, demonstraram que essas características proporcionaram a eficácia no momento de subjugar a presa e de defesa nos momentos de ameaças. Primeiramente dispõem de glândulas veneníferas especializadas, onde a peçonha é produzida em células epiteliais aprimoradas que forram a superfície interna e secretam a para o lúmen da glândula, onde é estocada. Além disso, possuem a denteção solenóglifa, ou seja, apresentam duas presas especializadas com canais no seu interior e móveis, no qual veneno é inoculado ativamente no tecido da presa semelhante a uma seringa (Figura 1C)(SILVEIRA JR ET AL., 2016).

Outro processo adaptativo foi na percepção do ambiente, dado que a visão possui algumas deficiências, as serpentes dispõem de outros órgãos sensoriais para suprir essa carência. A língua bífida ou bifurcada associada ao órgão de Jacobson ou Vomeronasal (que se

localiza em um orifício no palato) proporciona a capacidade detectar feromônios, captando partículas exaladas pela sua presa. A fosseta loreal, é localizada entre a narina e os olhos em cada lado da sua mandíbula, possuem terminações nervosas termorreceptoras, que permite a percepção das diferenças de temperatura no ambiente. (GUEDES, 2014;) (Figura 1A).

As cascavéis pertencem à família Viperidae e subfamília Crotalinae, que são representadas pelos gêneros *Crotalus* e *Sistrurus*. Essas serpentes possuem características anatômicas únicas que ajudam na sua identificação em relação a outras espécies de serpentes. A mais marcante característica é presença de um guizo ou chocalho na porção final de sua cauda, que deu a origem ao seu nome de origem grega que significa “castanhola” (BERNARDES, 2014) (Figura 1B).



Figura 1: Imagens mostrando características comuns pertencentes a *Crotalus durissus* sp. A – A seta mostra a fosseta loreal. B – Seta indica a característica marcante da espécie, o Guizo. C – Mostra a dentição presente na espécie. Fonte: Renato Augusto Martins

A espécie *Crotalus durissus* é subdividida em 12 subespécies com o registro de sete delas no Brasil sendo elas: *C. d. cascavella* nas áreas de caatinga do nordeste; *C. d. collilineatus* na região de Minas Gerais, São Paulo e Centro-oeste; *C. d. dryinas* no estado do Amapá; *C. d. marajoensis* na ilha de Marajó; *C. d. ruruima* região do norte; *C. d. terrificus* na região sul e sudeste e *C. d. trigonicus* no estado de Roraima. (VALLE; BRITES, 2012) (Figura 2).



Figura 2- Mapa de distribuição das subespécies de *Crotalus durissus* no território brasileiro (fonte: GONZAGA, 2017)

A subespécie *Crotalus durissus collilineatus* possui faixas longitudinais na região da nuca (característica morfológica distinta da espécie *Crotalus durissus*) e apresenta manchas romboides com o seu contorno mais evidenciado em cores claras (COSTA & BÉRNILIS, 2018) (Figura 2)



Figura 3- Espécimes da subespécie *Crotalus durissus collilineatus*. Destaque para o centro das manchas romboides visivelmente mais claros, característica morfológica principal da subespécie. Universidade Federal de Uberlândia, Setor de Manutenção de Répteis – Criadouro conservacionista da fauna silvestre- Finalidade Científica (Fonte: GIMENES, S.N.C. 2013)

O ofidismo representa um problema de saúde pública grave e negligenciado pelos países, principalmente em áreas onde o clima é mais quente e úmido, ou seja, no continente com áreas tropicais como na África, Ásia, América Latina e parte da Oceania. Assim a distribuição territorial é justificada pelo fato de que as serpentes são animais ectotérmicos e necessitam de uma fonte externa de calor para regular sua temperatura corporal. Além disso, os acidentes ocorrem com mais frequência em áreas rurais na qual há coincidência da época do plantio (época chuvosa) com a época de maior atividade das serpentes (GUTIERREZ, 2017).

De acordo com o Sistema de informação de agravos de notificação (SINAN) no Brasil, estima-se que entre os anos de 2000 a 2017, foram registrados 500.681 casos de acidentes ofídicos e 1.992 casos que chegaram a óbitos. Contudo, esses dados não representam a realidade devido a falha de comunicação entre os órgãos de saúde e a subnotificação da população.

1.2 Peçonha crotálica

A peçonha de origem animal é uma elaborada combinação de componentes orgânicos de baixa massa molecular (aminoácidos livres, peptídeos, carboidratos, lipídios, nucleotídeos, citratos), proteínas com ou sem propriedade enzimática (fosfolipases A₂, aminotransferase, fosfoesterases, proteases, hialuronidases, L-aminoácidos oxidases, acetilcolinesterases, ativadores de proteína C, lectinas, precursores de peptídeos bioativos), inibidores enzimáticos e compostos inorgânicos, que foi aprimorada em milhares de anos de evolução através da seleção natural para atuar com eficiência na relação presa e predador (CALVETE ET AL., 2009). Essa mistura complexa pode abranger inúmeros efeitos, como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, miotoxicidade, hemostasia (hemorragia, coagulação, fibrinólise e alteração na função plaquetária), lesões locais com edemas e entre outras reações (SAMPAIO ET AL., 2005).

A peçonha crotálica é composta principalmente por peptídeos e proteínas com ação neurotóxica. Esta se caracteriza por induzir nenhuma ou baixa lesão local, no entanto exibe intensa atividade neurotóxica, por bloquear as junções neuromusculares, e induzir atividade miotóxica sistêmica, podendo levar à morte por quadro de paralisia respiratória progressiva, ou por falência renal devido à rhabdomiólise (PINHO; FERREIRA, 2001; BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018).

A neurotoxicidade induzida pela peçonha crotálica é atribuída principalmente à crotoxina. Esta proteína representa cerca de 70 a 80% da composição total da peçonha (WARRELL, 2010). A sua estrutura dispõe de uma subunidade básica, que possui atividade fosfolipásica A₂ (PLA₂) de intensa toxicidade e que é o principal componente neurotóxico do veneno; e a subunidade ácida, a crotapotina, que potencializa as ações da PLA₂ (AGUIAR ET AL., 1997). A ligação entre as subunidades é fraca e reversível; e podem ser encontradas nas peçonhas sob forma livre ou associadas (FORTES-DIAS ET AL., 1994).

De acordo com os estudos de transcriptoma e proteoma da peçonha de *Crotalus durrisus collilineatus* realizados por Boldrini-França et al (2009), foi possível identificar além da presença majoritária da crotoxina, outras s principais toxinas que compõem esta peçonha, como crotamina, giroxina, serinoprotease, convulxina, lectina tipo-C indutora de agregação plaquetária, entre outras. A crotamina é um polipeptídeo catiônico, não enzimático e não citolítico, composto por 42 aminoácidos, rico em aminoácidos básicos, sendo nove lisinas e duas argininas, com peso molecular de aproximadamente 4,88 kDa. Dentre seus principais efeitos farmacológicos destacam-se a capacidade de induzir mitotoxicidade e neurotoxicidade, além disso, já foram demonstrados potenciais efeitos terapêuticos como antitumoral, antimicrobiana, antifúngica, antimalárica, dentre outras (EL CHAMY MALUF ET AL., 2016; PEREIRA ET AL., 2011; YAMANE ET AL., 2013). Em outro estudo realizado por Boldrini-França (2010), foi comprovada que essa toxina é variável entre as populações de serpente deste gênero (a nível individual), apresentando-se como crotamina-positivo, na presença desta toxina, ou crotamina-negativo, na ausência da mesma.

A Convulxina é uma glicoproteína neurotóxica de alta massa molecular, cerca de 70 kDa, que provoca distúrbios no sistema nervoso autônomo com efeitos que se caracterizam por convulsões tônico-crônicas, alterações circulatórias e respiratórias, ativação e agregação plaquetária na ausência de fibrinogênio (OGA, CAMARGO E BATISTUZZO, 2014). A girotoxina, também isolada desta peçonha, é um peptídeo trombina-símile, um fator importante de coagulação e apresenta diversas atividades, como amidásica, esterásica e fibrinogenolítica (KINI, 2006). As serinoprotease, as chamadas SVSPs são glicoproteínas com massa molecular variando entre 23 a 67 kDa catalisam uma ampla gama de reações que podem atuar em pontos distintos da via de coagulação, por ativação ou inibição específica de componentes envolvidos na agregação plaquetária, coagulação sanguínea e fibrinólise (BRAUD ET AL, 2000).

1.3 Classificação e características estruturais e funcionais das PLA₂s

As fosfolipases são enzimas amplamente distribuídas nos organismos vivos, estão envolvidas no catabolismo de lipídeos provenientes da dieta, bem como no metabolismo de lipídeos estruturais de membranas celulares, entre outros mecanismos, tais como processos de sinalização celular que culminam em vários efeitos incluindo ativação da resposta imune, proliferação celular, morte celular, etc (GARCIA DENEGRI *ET AL.*, 2010). Estas enzimas são classificadas em cinco tipos de acordo com o sítio de clivagem em fosfolipídios (**Fig. 2**), a saber: fosfolipase A₁, fosfolipase A₂, fosfolipase B, fosfolipase C e fosfolipase D (KINI, 1997) (Figura 3).

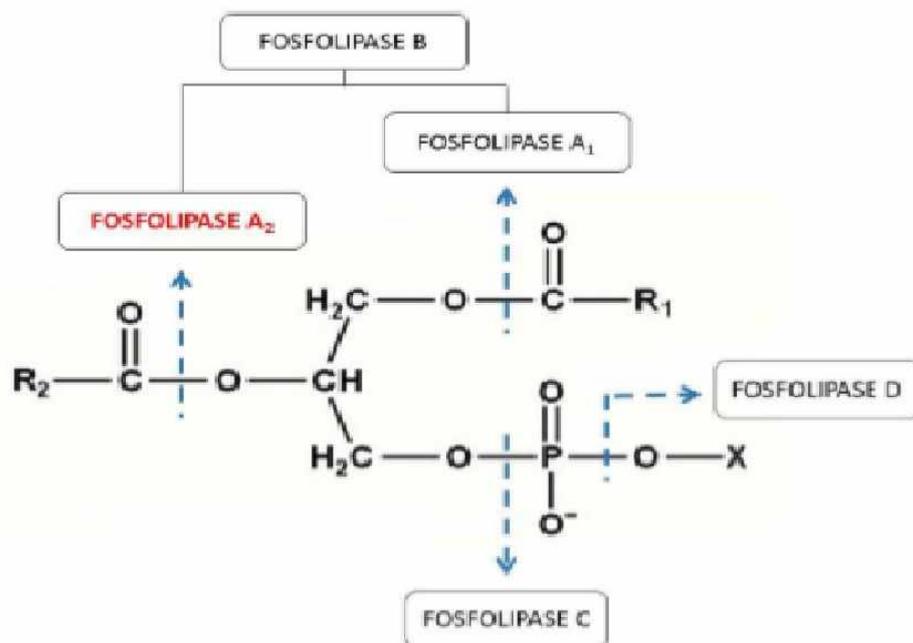


Figura 4. Sítios de hidrólise das fosfolipases. X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol. R1 e R2: cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos. Adaptado de KINI (1997).

As fosfolipases A₂ (PLA₂s) são enzimas lipolíticas capazes de hidrolisar a ligação ácil-éster na posição sn-2 dos glicerofosfolipídeos de membrana plasmáticas, liberando lisofosfatídeos e o ácido araquidônico, o qual é substrato das cicloxigenases (COX) do tipo 1 e 2, gerando prostaglandinas, leucotrienos, e tromboxanos (GARCIA ET AL., 2003).

As PLA₂ são classificadas de acordo com critérios físico-químicos, como localização celular, sequência de aminoácidos, peso molecular, presença de pontes de dissulfeto intramoleculares e necessidade de cálcio para a atividade enzimática (BROWN, W. J ET AL 2003). As PLA₂s estão agrupadas em seis grupos principais, entre os quais incluem as PLA₂s citosólicas (GIV cPLA₂), as PLA₂s Ca²⁺ independentes (GVI iPLA₂), acetilhidrolases – fatores ativadores de plaquetas (GVII e GVIII; PAF-AH), a PLA₂ lisossomal (GXV), as PLA₂s secretadas (sPLA₂) e de tecido adiposo específica (GXVI PLA₂) (LESLIE, 2015).

As sPLA₂ estão agrupadas em 16 grupos, sendo os grupos I-A e II-A representantes das PLA₂ presentes em peçonhas de serpentes, incluindo as famílias Elapidae e Viperidae, respectivamente (SCHALOSKE e DENNIS, 2006; DENNIS et. al., 2011). As sPL₂s desses grupos apresentam características estruturais e catalíticas em comum como a presença de cinco a oito pontes de sulfeto e uma histidina no sítio ativo; e requerem a presença de íons cálcio (Ca²⁺) para a realização de sua catálise (LESLIE, 2015). As sPLA₂ pertencentes ao grupo II-A pertencentes a família Viperidae são divididas em dois subgrupos principais: 1) cataliticamente ativas: PLA₂s que possuem um sítio de ligação ao cálcio o qual é coordenado pelo grupo β-carboxílico do resíduo Asp-49, que juntamente com os grupos carbonílicos dos resíduos Tyr-28, Gly-30 e Gly-32 e a presença de duas moléculas de água estruturalmente conservadas, formam a esfera de coordenação para ligação do Ca²⁺, sendo assim cataliticamente ativas; 2) cataliticamente inativas: substituição do resíduo Asp-49 (cadeia lateral negativa) por Lys-49 (cadeia lateral positivo) altera significativamente o sítio de ligação de Ca²⁺ nas fosfolipases A₂, impedindo a ligação deste íon e resultando em baixa ou inexistente atividade catalítica (ARNI ET AL., 1996; SOARES ET AL., 2000; BURKE E DENNIS, 2009; DOS SANTOS ET AL., 2009). Existem outras substituições de aminoácidos que resultam em modificações no sítio ativo, como os aminoácidos que ocupam as posições 28, 31 e 32 na Asp49 são Tyr, Leu e Gly, já no sítio das Lys49 essas posições são ocupadas pelos aminoácidos Asn, Val e Leu (ARNI e WARD, 1996, FERNANDES et. al., 2010, FERNANDES et. al., 2013).

A estrutura terciária das PLA₂ Lys49 (Figura 4) possui uma alfa hélice N-terminal (h1); uma “curta” hélice (*short helix*); um loop de ligação para o cálcio; duas alfa hélices antiparalelas (h2 e h3); duas folha beta anti-paralela (*β-wing*); e um *loop* C-terminal (CORRÊA, 2007; DE LIMA et. al., 2017).

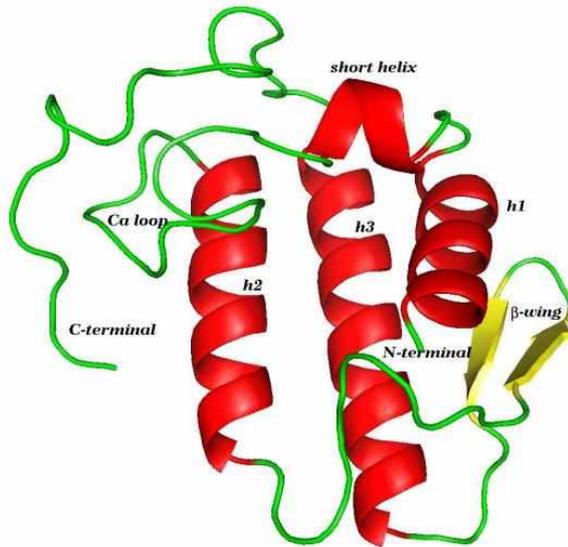


Figura 5: Representação esquemática do enovelamento de um monômero de PLA₂. (Fonte: CORRÊA, 2007)

As fosfolipases A₂ em solução formam estruturas oligoméricas (geralmente dímeros), sendo esse estado essencial para a sua atividade tóxica (ANGULO ET AL., 2005). Contudo mesmo não possuindo atividade catalítica as Lys49 apresentam a estrutura terciária semelhante às das PLA₂s catalíticas, sendo as diferenças na conformação oligomérica e sítios funcionais responsáveis pelas diferentes funções biológicas das fosfolipases A₂ Lys49 (DOS SANTOS ET AL., 2009; FERNANDES ET AL., 2014; BORGES ET AL., 2017).

As PLA₂s de peçonhas mostram um largo espectro de efeitos farmacológicos, tais como anticoagulação, inibição da agregação plaquetária, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, hipotensão arterial, aumento da permeabilidade microvascular, formação de edema, decorrentes da resposta inflamatória (GUTIÉRREZ E LOMONTE, 1997; HARRIS ET AL., 2000; SINGH ET AL., 2000; TEIXEIRA ET AL., 2003; SOARES ET AL., 2004; SANTOS-FILHO ET AL., 2008; KINI, 1997; ANDRIÃO-ESCARSO ET AL., 2002). Além disso, as PLA₂s também estão associadas com necrose muscular, um importante efeito local induzida por algumas peçonhas de serpentes, que pode levar a perda permanente de tecido e função que pode resultar na amputação do membro afetado (NISHIOKA e SILVEIRA, 1992).

A atividade catalítica das PLA₂s é crucial para que essas possam exercer os mais variados efeitos locais e sistêmicos observados após o envenenamento (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1997; SOARES *et al.*, 2004). No entanto, vários trabalhos demonstraram que tais sintomas também podem ser causados pela ação de PLA₂s Lys49, cataliticamente inativas (PÁRAMO *et al.*, 1998, SOARES *et al.*, 2000; CHACUR *et al.*, 2003, 2004).

1.4 Inibidores de fosfolipase A₂

A literatura científica descreve uma variedade de animais resistentes a ação tóxica das peçonhas de serpentes, estes incluem diversos mamíferos como o *Didelphis marsupialis* (ROCHA et al 2002), serpentes peçonhentas e não peçonhentas, como as do gênero *Python sebae* (DONNINI ET AL 2011).

Dessa forma, as proteínas plasmáticas capazes de inibir a atividade de PLA₂ são denominados Inibidores de Fosfolipase A₂ (PLI). Os PLIs são glicoproteínas, oligoméricas, globulares e ácidas (LIZANO ET AL, 2003).

De acordo com Inoue et. al (1991), Thwin et. al (2002) e Lizano (2003), os inibidores de fosfolipase A₂ (PLI) são classificados em três diferentes grupos de acordo com a sua estrutura. A primeira classe, conhecida como α (α PLI), tem como principal característica um domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) similar ao de Lectinas Tipo-C, e que possivelmente reconhece e liga-se à enzima, impedindo o efeito catalítico sobre a membrana celular.

A segunda classe é conhecida por β (β PLI) e possui como principais características várias e sucessivas repetições ricas em leucinas, e quatro sítios de N-glicosilação. Segundo Okumura et al (1998), é demonstrada uma homologia com a α 2-glicoproteína humana – que também inibem preferencialmente as PLA₂s básicas das peçonhas de serpentes do grupo II.

Por fim, os inibidores da classe tipo gama (γ PLI) são os que apresentam o maior espectro de inibição frente às sPLA₂ (INOUE, 1997; FORTES-DIAS, 1999), e são reconhecidos por algumas características marcantes, como regiões ricas em prolina que mantém a conformação estrutural de sítios que permitem uma melhor interação com PLA₂s (DUNN E BROADY, 2001), e dois conjuntos de repetições intramoleculares de domínios ricos em cisteína, denominado motivo *Three-fingers* (OHKURA ET AL., 1999) – que se assemelha com o receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PAR) (DUNN, 2001).

Gimenes e colaboradores (2014) isolaram e caracterizaram estruturalmente e funcionalmente um inibidor tipo gama denominado de γ CdcPLI do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus*. Esta proteína apresenta massa molecular de 22.344 Da com alta similaridade com outros inibidores do tipo γ . É capaz de formar oligômeros em solução e inibir satisfatoriamente as atividades enzimática, miotóxica e citotóxica de PLA₂s de peçonhas botrópicas.

O potencial antitumoral, antimetastático e antiangiogênico do γ CdcPLI também foi amplamente estudado (GIMENES ET AL., 2017). Estes autores demonstraram que o γ CdcPLI foi mais citotóxico sobre a linhagem celular tumoral de mama MDA-MB-231 do que para outras linhagens celulares (MCF-7, HeLa, PC3 and A549), este não afetou a viabilidade das células de mama não-tumorigênicas (MCF 10A). Além disso, o γ CdcPLI induziu a modulação de importantes mediadores da via de apoptose, como o p53, MAPK/ERK, BIRC5 e MDM2. Interessantemente, o γ CdcPLI também inibiu a adesão e migração de células endoteliais humanas e bloqueou a angiogênese por diminuir a formação de vasos em células HUVEC (*in vitro*) e formação de prolongamentos celulares em modelo *ex vivo* de fragmento de aorta, além de reduzir a produção de fator de crescimento endotelial (VEGF). O inibidor γ CdcPLI diminuiu os níveis de PGE2 nas células MDA-MB-231 e inibiu a expressão de genes e proteínas da via de sinalização do PI3K/Akt. Além disso, o γ CdcPLI inibiu os efeitos pró-inflamatórios da BnSP-7, uma PLA₂ isolada da peçonha de *Bothrops pauloensis*.

1.5 Expressão heteróloga

À medida que o papel de PLA₂ em processos inflamatórios, tumorais, parasitários e outras situações fisiopatológicas são demonstrados (SANTORO, M.L 1999; TEIXEIRA ET AL., 2003; CHIOATO L, WARD RJ 2003), percebe-se a necessidade de se obter mais informações sobre seus inibidores nativos, tanto em nível estrutural quanto funcional, para que se criem protótipos para a síntese de novas formulações farmacêuticas. Os inibidores de PLA₂s oriundos do plasma de serpentes têm sido estudados demonstrando um alto potencial terapêutico em patologias nas quais as PLA₂s protagonizam vários eventos moleculares (BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. 2009). A obtenção dessas moléculas na forma nativa é um fator limitante uma vez que requer procedimentos de coleta de sangue de animais peçonhentos, que na maioria das vezes tem baixo rendimento além do estresse causado ao animal. Assim, com o auxílio de técnicas de biologia molecular, a obtenção dessas proteínas de forma heteróloga pode levar a uma alta produtividade e versatilidade na obtenção das mesmas, contribuindo para o avanço de estudos que visam explorar seus potenciais de ação.

Entre os mais diversos sistemas de expressão heteróloga, a utilização da bactéria *Escherichia coli* tem um grande potencial devido a sua genética bem elucidada, o seu crescimento em meio de cultura rápido, inúmeros vetores bacterianos e cepas mutantes

disponíveis (SWARTZ, 2001). Ao se considerar que o processo de expressão ocorre no citoplasma, há algumas complicações como a falha no dobramento proteico, os corpos de inclusão que isolam a proteína devido a seu alto grau de insolubilidade, a não glicosilação da proteína e a perda da atividade biológica. Porém as maiores vantagens são que os corpos de inclusão proporcionam especificidade no isolamento, trazendo mais pureza de proteínas, aumento do seu rendimento e além de facilitar a recuperação do material com menos contaminantes provenientes da degradação da bactéria (SCHMIDT, 2004). Nesse contexto, o presente estudo apresenta a obtenção do inibidor γ CdcPLI de *C. d. collilineatus* na sua forma recombinante a partir de sistema de expressão heteróloga em bactéria *E. Coli* (Roseta Gami B) e sua capacidade de inibir a atividade PLA₂ de peçonha botrópica.

2. Objetivos

2.1 Objetivo geral

- Expressar e purificar o inibidor recombinante γ CdcPLI de *Crotalus durissus collilineatus*, bem como avaliar sua capacidade em inibir a atividade fosfolipásica A₂ *in vitro* da peçonha de *Bothrops pauloensis*

2.2 Objetivos específicos

- Induzir a expressão do γ CdcPLI em bactéria *E. Coli* (Roseta Gami B)
- Obter a fração solúvel contendo γ CdcPLI por lise osmótica e criólise.
- Purificar o γ CdcPLI em colunas de cromatografia de troca-iônica e afinidade.
- Avaliar a homogeneidade da proteína por SDS-PAGE.
- Avaliar a inibição da atividade PLA₂ do γ CdcPLI sobre a peçonha de *Bothrops pauloensis* por titulação potenciométrica

3. Materiais e Metodos

3.1 Reagentes

Meio LB-Medium liquido (pH 7,4 ; 1% Ampicilina); 0,4mM IPTG (SIGMA ALDRICH); Tampão de Lise (10mM de Tris-HCl, pH 8; 50 mM de Na₂PO₄; 300 mM de NaCl; 0,05% Tween 20); Padrão de peso molecular (GE Healthcare); Tampão desnaturante (10mM de Tris-HCl; 100 mM de Na₂PO₄; 6 M de Ureia); Lisozima (0,25 mg/mL) (SIGMA ALDRICH); Tampão de amostra (SDS 8%; Azul de bromofenol; Glicerol 40%; 2- β-mercaptoetanol 20%; Tris); Gel de poliacrilamida com agentes desnaturante (SDS-PAGE); DNase (3 μg/mL); Colunas de cromatografia Q-Sepharose Fast Flow e Afinidade NHS (N-hydroxysuccinimide) (GE Healthcare);. Outros reagentes foram utilizados em grau analítico.

3.2. Obtenção da peçonha

A peçonha de *Bothrops pauloensis* foi coletada de serpentes mantidas no serpentário Centro de Extração de Toxinas Animais, Ltda. - CNPJ: 08.972.260 / 0001-30, Morungaba, SP, Brasil. Este serpentário obteve comprovação de registro no IBAMA e uso de recursos naturais renováveis (n ° 2087163).

3.3 Obtenção do gene sintético do inibidor γ CdcPLI

O gene sintético do inibidor γ CdcPLI foi construído de acordo com a seqüência de aminoácidos e nucleotídeos da proteína nativa (GIMENES ET AL., 2014) e inserido no vetor de expressão pHis Parallel II com os sítios de restrição para NdeI e XhoI (*Gene Script, USA*). A linhagem *E. Coli* (Roseta Gami B) contendo o vetor de expressão pHis Parallel II com o inserto do gene codificante da proteína γ CdcPLI foi gentilmente cedida pela Dra Sarah Natalie Cirilo Gimenes do Instituto Butantan (São Paulo, Brasil).

3.4 Dosagem proteica

As dosagens de proteínas em soluções foram realizadas utilizando o método estabelecido por Bradford (1976). Nesse ensaio, uma alíquota de cada amostra foi dissolvida

para 10 μ L com água deionizada e adicionados 190 μ L do reagente de Bradford (100mg de Comassie Blue G, 50 mL de etanol 100%, 100mL de ácido fosfórico 85%, (v/v) e água deionizada suficiente para completar 1 litro de solução). As determinações das concentrações de proteínas foram realizadas em triplicatas e a absorbância medida a 595nm. Paralelamente à dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de soro albumina bovina (1mg/mL), considerando o coeficiente de extinção molar em 280nm (0,665). A concentração de proteínas em μ g/ μ L foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

3.5 Expressão do inibidor r γ CdcPLI

3.5.1 Preparação do pré inóculo

Inicialmente, a indução da expressão da proteína utilizou a cepa *E. coli* Roseta Gami B contendo o vetor do inibidor r γ CdcPLI armazenada em glicerol 50% estéril -80°C. Posteriormente, seguiu-se a preparação de um pré-inoculo contendo meio LB líquido pH 7.4, 1% de ampicilina e glicerol estéril 50% (v/v), incubado a 37°C sob agitação a 117 rpm. Posteriormente, ao observar a absorbância de OD₆₀₀ a 0,6 iniciou-se o crescimento bacteriano.

3.5.2 Preparação do inoculo e indução da expressão

A expressão foi realizada adicionando 3mL do pré- inóculo obtido conforme descrito no item 3.5.1 em 1 L meio de indução LB a 37°C em agitação até a OD₆₀₀ alcançar o valor de 0,6. Em seguida foram adicionados 400 μ L de IPTG 0.4mM (Isopropyl β -D-1-thiogalactopyranoside) ao meio sob agitação a 117 rpm, por mais 24 horas a 25°C. A amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min e o *pellet* foi submetido a lise celular com uma solução de Tris-HCl 10 mM, Na₂PO₄ 50mM, NaCl 300 mM e Tween-20 5% (v/v). Os produtos da lise celular foram submetidos ao congelamento por nitrogênio líquido e descongelamento em banho-maria a 37°C, três vezes consecutivas, seguido de tratamento com 1mL de lisozima 0,25 mg/mL por 15 minutos a temperatura ambiente e em seguida, foi utilizado ultrassom com pulsos a cada 30 segundos por 10 minutos. Ao final foi adicionado 69 μ L DNase (3 μ g/mL) por 15 minutos.

O extrato bacteriano obtido da etapa anterior foi centrifugado a 20.000 g por 10 min a 4°C. O *pellet* foi ressuscitado em Tris-HCl 10mM pH 8,0, Na₂PO₄ 100 mM, Ureia 6M sob

agitação até homogeneizar. Por fim, a amostra foi centrifugada a 10000 rpm por 10 min a 4°C e o sobrenadante armazenado para purificação da fração solúvel do inibidor.

3.6 Purificação do inibidor rγCdcPLI

3.6.1 Cromatografia de troca iônica em Q-Sepharose *Fast Flow*

Inicialmente, a amostra (10mL) contendo o rγCdcPLI em Tris-HCl 10mM pH 8,0; Na₂PO₄ 100 mM, Ureia 6M) foi aplicada na coluna HiTrap Q-Sepharose *Fast Flow* (AmershamBiotec, São Paulo, Brasil), previamente equilibrada com 5 mM de bicarbonato de amônio (AMBIC), pH 7,4 e 6M de Ureia (Sigma, St. Louis, MO, EUA). Aplicou-se então um gradiente linear (AMBIC 5 mM e ureia 6 a 0 M, pH 7,4) a um fluxo de 0,1 mL / min. Além disso, na mesma coluna, aplicou-se um segundo gradiente linear (AMBIC 5 mM pH 7,4 e NaCl 1M) e recolheram-se frações de 1 mL / tubo a um fluxo de 0,1 mL / min.

3.6.2. Cromatografia de afinidade em coluna NHS-BnSP-7

As frações contendo o rγCdcPLI, obtidas da etapa anterior foram aplicadas à coluna de afinidade NHS-Hitrap (N-hidroxissuccinimida) (GE Healthcare - United Kingdo) imobilizada com PLA₂ BnSP-7 (Gimenes, 2013) previamente equilibrada com Tris-HCl 10 mM pH 7,5. O rγCdcPLI foi eluído utilizando-se um gradiente linear de glicina-HCl 100 mM pH 2,0 a um fluxo de 0,1 mL / min no sistema *AKTA Prime Plus* (Amersham Biosciences - Reino Unido). O pH das frações eluídas foi imediatamente ajustado com Tris-HCl 1 M pH 8,0. As frações foram dialisadas contra 5 mM de AMBIC, pH 7,4 e 4 M de ureia (*overnight*), seguidas por 5 mM de AMBIC e 2 M de ureia (24 h) e finalmente duas vezes contra 5 mM de AMBIC sem ureia durante 24 horas.

3.7 Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE)

A homogeneidade da amostra eluída da cromatografia de afinidade foi verificada em gel de poliacrilamida a 12,5 % (m/v) em condições redutoras segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970) e também preestabelecidas de acordo com o sistema de eletroforese Hoefer SE 260 MightySmallIII. O sistema de SDS-PAGE foi feito com gel de empilhamento a 3%

composto por Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8), SDS a 0,1% (m/v); e um gel de separação a 12,5% constituído por Tris-HCl 1,5 M (pH 8,8) e SDS a 0,1% (m/v), ambos com bis:acrilamida (proporção de 0,8:30). Em seguida, as amostras foram preparadas e aquecidas a 100°C por 5 minutos em 0,06M Tris-HCl (pH 6,8), azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 20% (v/v) e aplicadas no gel de corrida com o tampão composto por Tris 0,025M, Glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v) (pH 8,3). Após a corrida, os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e etanol 1:1 (v/v) e descorados em uma solução de ácido acético 7% e etanol 30% (v/v).

3.8 Inibição da atividade fosfolipásica pelo r γ CdcPLI

A atividade PLA₂ da peçonha de *Bothrops pauloensis* (10 μ g) foi determinada por titulação potenciométrica segundo o método descrito por De Haas *et al* (1968). Como substrato foi utilizado uma emulsão de gema de ovo (uma gema completando o volume para 50 mL com água Mili-Q) em presença de desoxicolato de sódio 0,03 M e CaCl₂ a 0,6 M (15 mL da solução aquosa de gema de ovo, 10 mL de desoxicolato de sódio e 1 mL de cloreto de cálcio, completando o volume de 100 mL com água destilada). Os ácidos graxos liberados enzimaticamente foram titulados com uma solução padrão de NaOH 0,1N em pH 8,0 e temperatura ambiente. A atividade fosfolipase A₂ foi expressa em microequivalentes de base consumida por minuto/mg de proteína. Por definição, 1 unidade de atividade PLA₂ corresponde ao consumo de 1 microequivalente de base por mg de proteínas em um minuto.

Para os ensaios de inibição, as amostras contendo a peçonha bruta de *B. pauloensis* (10 μ g) foram previamente incubadas com o r γ CdcPLI nas proporções de 1:2,5; 1:5 (m/m) (peçonha bruta/recombinante) por 30 min a 37°C.

3.9 Análise Estatística

A montagem dos gráficos, cálculos das médias e desvios padrões das médias foram realizadas com auxílio do *software* Prism 5 (GraphPad 5 Software Inc.). A determinação das significâncias entre as médias (análise de variância) e os testes de significância da diferença entre duas médias foram realizados utilizando-se o Teste t de Student, e os valores de $p < 0,05$

foram considerados estatisticamente significantes. Os dados foram apresentados como média ou desvio padrão.

4. Resultados

4.1 Obtenção do r γ CdcPLI

A indução da expressão do r γ CdcPLI foi monitorada após 4 h, 6 h e 24 h a 600 nm e comprovada por SDS-PAGE a 12,5% (**Figura 5**). Como pode ser observado, há a presença de uma banda proteica na faixa de 25kDa após 2 horas de indução da expressão, cuja intensidade foi intensificando com o aumento do intervalo de incubação (4, 6 e 24 horas). Após o intervalo de 24 horas de indução da expressão da proteína recombinante observa-se uma maior intensidade da banda proteica na faixa 25kDa.

Após verificar que a proteína de interesse era expressa em todos os intervalos de tempo analisados, seguiu-se a expressão a 24 h para a obtenção de massa proteica a fim de se iniciar as etapas de purificação do inibidor recombinante.

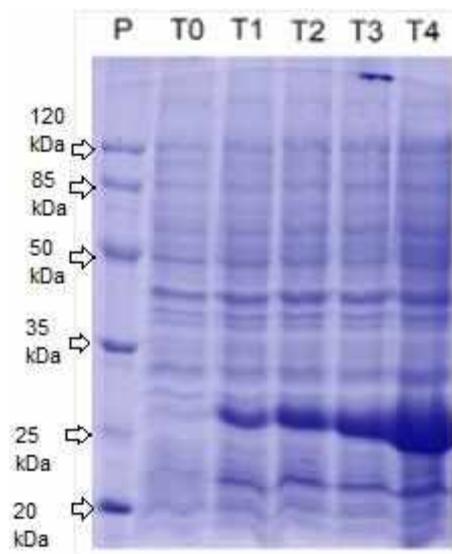


Figura 6- Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) 12,5% dos tempos de indução, T0 – Antes de iniciar a indução pelo IPTG, T1- Início da indução após 2 horas, T2- 4 horas, T3- 6 horas e T4- 24 horas. P: marcador de massa molecular. Padrão de beta-galactosidase (120kDa), bovine serum albumin (85kDa), ovalbumin (50kDa), carbonic anhydrase (35kDa), beta-lactoglobulin (25kDa), lysozyme (20kDa)

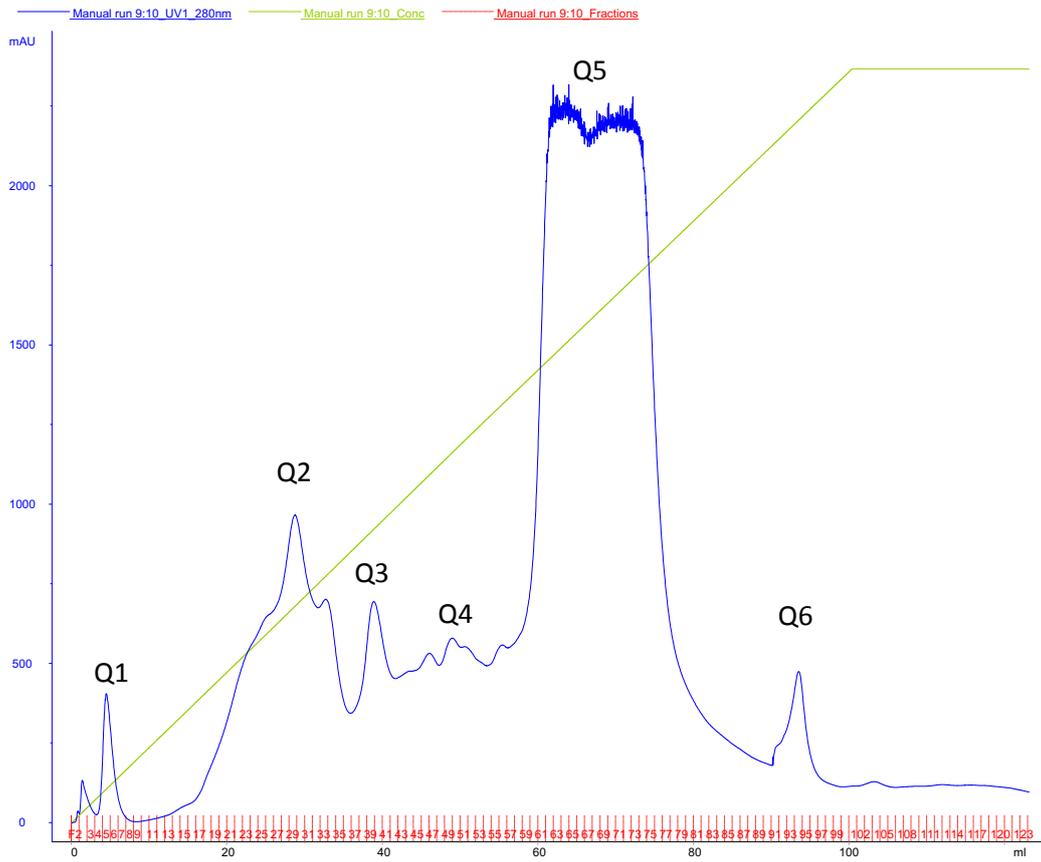
4.2 Purificação do rγCdcPLI

A purificação do inibidor rγCdcPLI ocorreu em duas etapas cromatográficas, iniciando-se com troca-iônica seguida de afinidade (Figura 6). O primeiro passo cromatográfico utilizando o sobrenadante proteico após lise bacteriana foi realizado em uma coluna de troca aniônica Q-Sepharose *Fast Flow*, onde a amostra foi eluída após a utilização de um gradiente linear decrescente contendo NH_4HCO_3 5mM pH7,5 e Ureia (6M a 0M) (resultado não demonstrado). Em seguida, utilizando ainda a mesma coluna iniciou-se um gradiente linear crescente contendo NH_4HCO_3 5mM pH 7,5 e NaCl, (0M a 1M). Esta etapa resultou em 6 frações denominadas (Q1 a Q6) (**Figura 6A**) que após analisadas em SDS-PAGE 12,5% (v/v) demonstraram-se bastante heterogêneas. As frações Q4 e Q5 apresentaram a presença de uma banda proteica na faixa de 25kDa (**Figura 6B**).

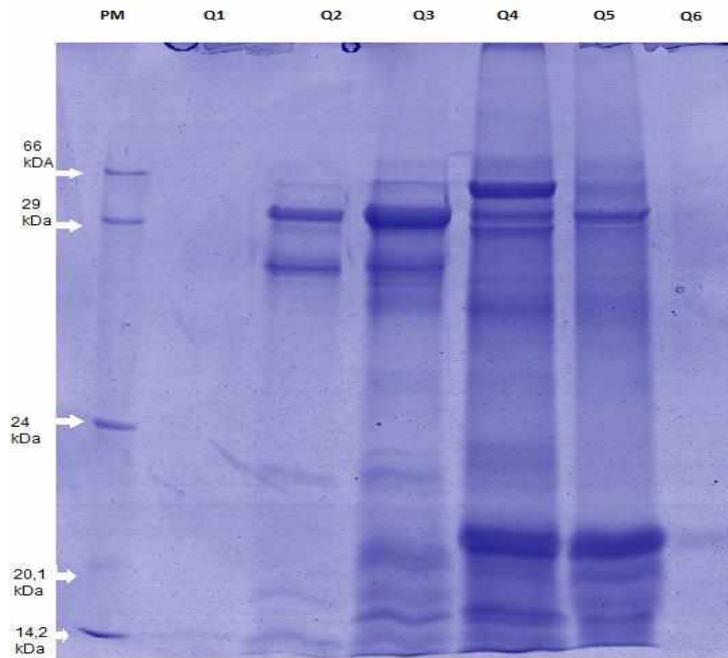
Posteriormente, a fração Q4 foi submetida a cromatografia de afinidade em NHS-Hitrap acoplada com PLA_2 BnSP-7 (**Figura 6C**). Observa-se que a proteína de interesse foi eluída da coluna com uma leitura de absorvância (aproximadamente 800 a 900 mAU), esta fração mostrou-se homogênea após SDS-PAGE a 12, 5 % (**Figura 6D**).

A expressão do inibidor foi satisfatória no tempo de 24h e após a purificação a fração Q4 apresentou um rendimento de 74 mg/L de meio de indução, enquanto o inibidor recombinante apresentou rendimento total de 428,75 $\mu\text{g/L}$ de meio de indução o que representa 0,58% da fração Q4.

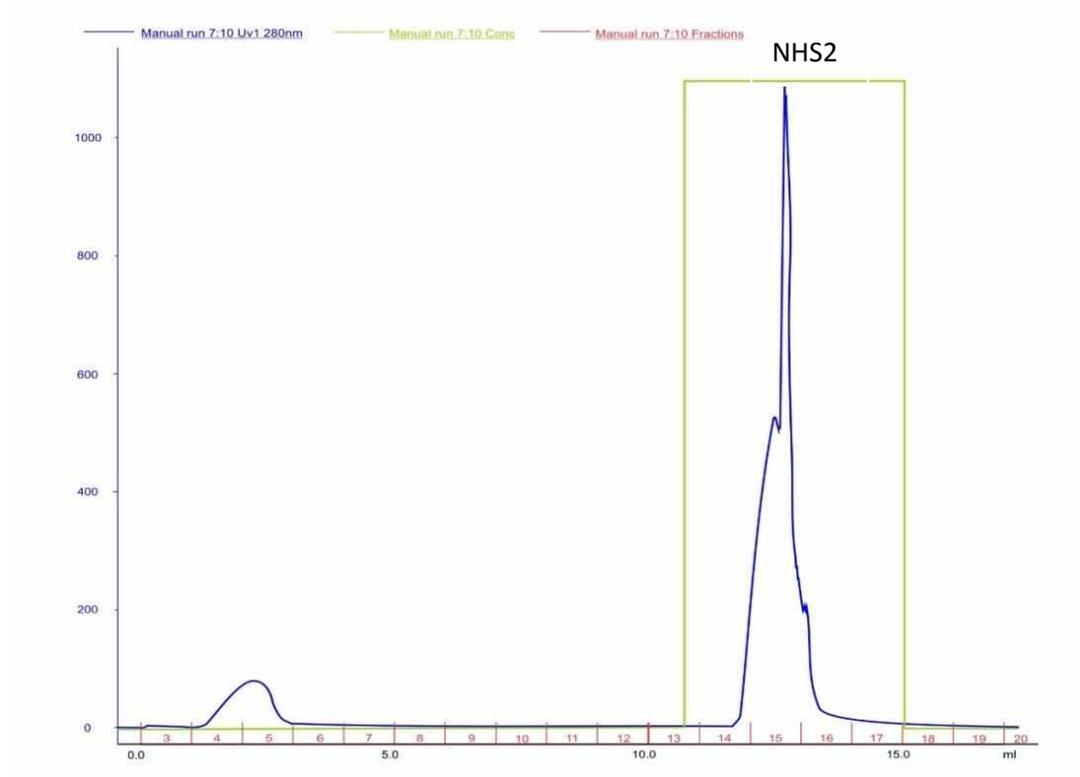
A



B



C



D

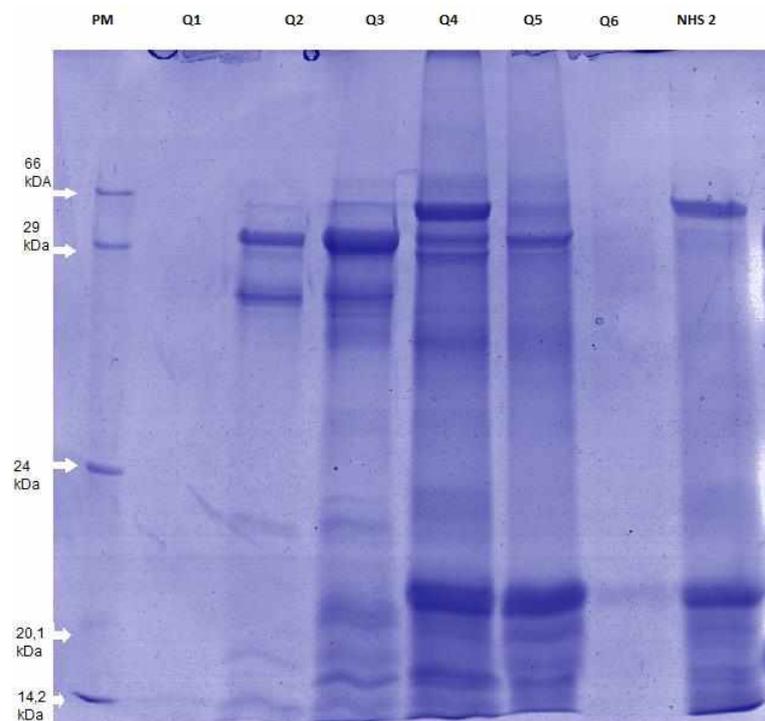
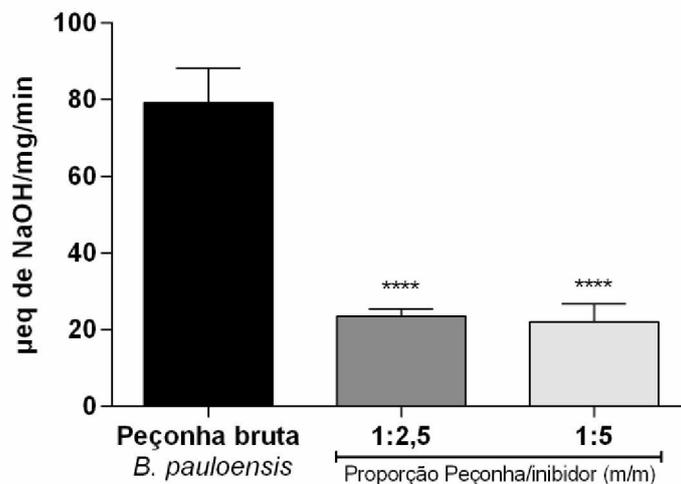


Figura 7- Perfis cromatográficos obtidos através de dois métodos de purificação. A- Perfil da cromatografia por troca iônica pela Hitrap Q-Sepharose acoplada ao sistema AKTA Prima GE Healthcare. As frações Q1,Q2,Q3,Q4,Q5,Q6 foram eluídas em gradiente linear crescente

contendo NH_4HCO_3 5mM pH 7,5 e NaCl, (0M a 1M). **B-** Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) 12,5% (v/v) das frações Q1 a Q6. **C-** Perfil da cromatografia por afinidade obtida pela afinidade NHS Hitrap (N-hydroxysuccinimide) previamente imobilizada com a PLA_2 BnSP-7. **D-** Eletroforese em gel de poliacrilamida com agentes desnaturantes (SDS-PAGE) 12,5% (v/v) das frações Q1 a Q6 com NHS2 (ryCdcPLI). PM- Albumina Bovina 66 kDa; Anidrase carbônica 29 kDa; tripsinogênio 24 kDa; Inibidor de tripsina 20,1 kDa; α -lactoalbumina 14,2 kDa.

4.3 Inibição da atividade fosfolipásica da peçonha de *Bothrops pauloensis* pelo ryCdcPLI

A atividade inibitória do ryPLICdc obtido no presente estudo foi avaliada sobre a atividade PLA_2 da peçonha de *B. pauloensis* (Figura 8). Como pode ser observado o ryCdcPLI foi capaz de inibir significativamente, cerca de 80% a atividade PLA_2 da peçonha de *Bothrops pauloensis* nas proporções 1:2,5 e 1:5 (m/m) (peçonha/ryCdcPLI.)



** Significância estatística foi de $p < 0,0001$ comparado com o controle (peçonha bruta)

**Para cada inibição foi utilizado 10µg de Peçonha Bruta

**O desvio padrão foi 6,03 para a proporção 1:2,5. Para a proporção 1:5 o desvio padrão foi de 17,52

**Valores significativos de acordo com a análise estatística. Foi utilizado o teste ANOVA e Kruskal-Wallis, com significância de $p < 0,05$, com o software Prisma 5.0

Figura 8. Inibição da atividade fosfolipásica A₂ pelo método potenciométrico utilizando como substrato uma emulsão de gema de ovo na presença de deoxicolato e cloreto de cálcio. A peçonha bruta (P.b) de *Bothrops pauloensis* foi utilizada como controle e o inibidor recombinante foi pré-incubado com a peçonha bruta de *Bothrops pauloensis* nas proporções 1:2,5 e 1:5 (Peçonha/inibidor) (m/m).

5. Discussão

As enzimas PLA₂ de peçonhas de serpentes são muito investigadas dada a grande variedade de seus efeitos farmacológicos, como cardiotoxicidade, anticoagulação, neurotoxicidade, miotoxicidade, ativação e/ou inibição da agregação plaquetária, edema, convulsão, hipotensão, hemorragia, dentre outras. Desta forma questionamentos da resistência das próprias serpentes sobre o efeito deletério dessas enzimas em seu organismo, traz novas perspectivas sobre os inibidores em seu sangue (BOLDRINI-FRANÇA ET AL, 2009).

Atualmente existem pesquisas que mostram o avanço na caracterização desses Inibidores de Fosfolipases (PLI) de serpentes peçonhentas, a exemplo da espécie *Crotalus durissus collilineatus*, de cujo soro foi isolado o inibidor γ CdcPLI nativo, e foi demonstrado o seu potencial em inibir as atividades enzimática, citotóxica e miotóxica induzidas por diferentes PLA₂s botrópicas (GIMENES ET AL., 2014,). Outro inibidor de PLA₂ foi também purificado do soro da mesma espécie (*Crotalus durissus terrificus*), denominado CNF, o qual neutralizou o efeito tóxico da crotoxina (FORTE- DIAS et. al. 1999). Além disso, foi purificado do sangue da serpente *Notechis scutatus* o inibidor NSI, que demonstra uma grande especificidade para sPLA₂e que é capaz de inibir uma sPLA₂ humana em doenças como osteoartrite e artrite reumatoide (HAINS ET AL., 2001).

A engenharia genética utilizando sistemas de expressão microbianos tem criado proteínas recombinantes com mesma estrutura e atividades biológicas. Nesse contexto, a obtenção de toxinas ofídicas e inibidores plasmáticos nativos, têm sido um tema recorrente na área científica. Assim consegue-se evitar problemas para a obtenção de peçonhas e soro de animais para a purificação de proteínas de interesse, evitando o estresse do animal, necessidade de vários exemplares, variação qualitativa e quantitativa das amostras sujeitando a alterações em suas propriedades e atividades biológicas. (GONZÁLES E FILLAT, 2018). Para sistemas de expressão microbianos, a bactéria mais utilizada tem sido a gram-negativa *E. coli*, devido ao

seu grande potencial e sua genética bem elucidada, o seu crescimento em meio de cultura rápido, inúmeros vetores bacterianos e cepas mutantes disponíveis.

Várias pesquisas têm demonstrado a expressão de toxinas e inibidores plasmáticos recombinantes, visando sua aplicação em estudos farmacológicos e na soroterapia para acidentes ofídicos (ZHENLEA ET AL., 2015; SANTOS-FILHO ET AL., 2014; THWIN ET AL., 2000). Recentemente Russo et al (2019) expressaram uma PLA₂ do complexo crotoxina e demonstraram seu efeito virucida contra os vírus da dengue, zika, chikungunya e febre amarela. Além de serpentes peçonhentas foi avaliado por Donnini et al (2011) efeitos citotóxicos e anti proliferativos produzidos por γ PLIs recombinantes provindos da serpente não venenosa *Phyton sebae*, demonstrado recentemente em células tumorais de camundongos. O inibidor reduziu os tumores em até 60% e a sobrevivência dos animais do ensaio foi prolongada e a atividade demonstrou-se mais intensa nas células tumorais do que nas saudáveis (DONNINI ET AL., 2011)

Assim, este trabalho teve como objetivo expressar, purificar e avaliar a inibição da atividade fosfolipásica do inibidor recombinante γ CdcPLI, cuja expressão foi inicialmente demonstrada por Gimenes e colaboradores (2019) (Patente submetida a Agencia Intellecto da Universidade Federal de Uberlândia.

O sistema de expressão *Rosetta-gami B strain* foi capaz de expressar satisfatoriamente o inibidor recombinante nos intervalos de 1 a 24 h de indução. Com o intervalo de 24 horas foi possível adquirir uma massa expressiva da proteína para a continuidade dos experimentos de purificação. Alguns autores tem demonstrado a purificação de inibidores de PLA₂s utilizando *His-tag* como um processo fácil e eficaz (SANTOS-FILHO ET AL., 2014). No entanto, com o intuito de manter a estabilidade estrutural e funcional da proteína, esta foi expressa sem *His-Tag* e isolada de acordo com as metodologias utilizadas por Gimenes et al (2013 e 2017) que demonstraram a obtenção do γ CdcPLI nativo e suas propriedades bioquímicas e farmacológicas, respectivamente.

O perfil cromatográfico em HiTrap Q-Sepharose *Fast Flow* (Amersham Biotec, São Paulo, Brasil) apresentou algumas similaridades com o do nativo γ CdcPLI, pois em ambos foram possíveis obter 6 frações (Q1 a Q6). As frações Q4 e Q5 apresentaram uma banda na faixa de 25kDa correspondente a massa molecular do inibidor nativo. No entanto, neste trabalho foi utilizada apenas a fração Q4 para a purificação do γ CdcPLI, contido no soro de *C. d*

collilineatus. Isso provavelmente, explica o baixo rendimento na purificação do mesmo, uma vez que a fração Q5 é enriquecida na proteína, como visualizado na análise por SDS-PAGE.

A fração Q4 após a cromatografia de afinidade resultou em dois picos distintos, sendo que o ryCdcPLI foi eluído após o tratamento da resina com o tampão glicina pH 2,0 o qual promoveu o desligamento de proteínas ligadas a coluna. A PLA₂ BnSP-7 Lys-49 isolada da peçonha de *B. pauloensis* (SOARES ET AL. 2000) foi previamente acoplada a essa coluna de acordo com a metodologia empregada por Gimenes et al (2014) para promover a interação do inibidor recombinante com a PLA₂, e assim garantir o sucesso na sua purificação. A utilização de colunas de afinidade para a purificação de inibidores de PLA₂s também foi demonstrado previamente (OLIVEIRA ET AL., 2011). Neste trabalho os autores isolaram um inibidor de PLA₂ Tipo- γ do plasma da serpente *B. jararacussu* utilizando uma coluna de afinidade contendo acoplada a resina a PLA₂ Lys-49 BthTx-I. Posteriormente, um inibidor de fosfolipase A₂ tipo α presente no plasma da serpente *Bothrops alternatus* foi isolado utilizando essa mesma abordagem metodológica (SANTOS-FILHO, 2012)

A capacidade inibitória do ryCdcPLI frente à peçonha bruta de *B. pauloensis* reforçou uma característica marcante dos inibidores dessa classe. Estes apresentam um domínio responsável pelo reconhecimento da região de ligação do Ca²⁺ de PLA₂, independente da carga que a PLA₂ possua. Tal característica compartilhada pela classe garante o alto espectro de inibição em todos os grupos de PLA₂ (IA, IIA e IIIA) (Dunm, 2001). E dessa forma, pode-se inferir que o ryCdcPLI provavelmente inibiu a atividade PLA₂ da peçonha de *B. pauloensis* por interagir com o domínio de ligação do Ca⁺² de PLA₂s cataliticamente ativas. No entanto, ensaios adicionais serão necessários para se averiguar a capacidade inibitória do ryCdcPLI sobre diferentes classes de PLA₂s presentes nessa peçonha.

Os mecanismos moleculares envolvidos na interação γ PLI/PLA₂s foram primeiramente elucidados a partir de experimentos contra neurotoxinas presente em peçonha de serpentes (OVADIA E KOCHVA, 1977). Estes autores demonstraram pela primeira vez um provável mecanismo de inibição na formação de um complexo não covalente toxina-inibidor. Perales e colaboradores (1995) demonstraram que inibidores do tipo γ (CNF e CICS) purificados a partir do plasma de *Crotalus durissus terrificus* foram capazes de neutralizar o efeito tóxico da crotoxina (FORTES-DIAS, 1991; PERALES ET AL., 1995). O inibidor CICS foi capaz de suprimir a atividade da crotoxina e sua toxicidade em ensaios *in vivo* (FORTES-DIAS, 1991; FORTES-DIAS ET AL., 1994; FORTES-DIAS, 1999). Ensaios de Ressonância Plasmônica de Superfície demonstraram que o inibidor CICS é capaz de formar complexos monoméricos e

multiméricos com β -Neurotoxinas encontradas nas peçonhas das serpentes *Crotalus scutellatus*, *Crotalus durissus terrificus* e *Pseudocerastes fieldi*. Este estudo demonstrou ainda que o inibidor CICS não é capaz de interagir com as subunidades não catalíticas das PLA₂ β -Neurotoxinas. Além disso, a ligação com o inibidor induz a dissociação do heterocomplexo formado pelas subunidades catalíticas e não catalíticas das PLA₂ β -Neurotoxinas (FAURE, 2000).

Aparentemente o inibidor ryCdcPLI apresenta um potencial inibitório sobre a atividade PLA₂ da peçonha de *B. pauloensis* semelhante ao inibidor nativo. No entanto novos estudos são necessários para se traçar um melhor perfil de inibição frente a diferentes classes de PLA₂s bem como diferentes atividades biológicas induzidas por estas, tais como a atividade miotóxica, edematogênica, inibição da agregação plaquetária, etc.

6. Conclusão

Neste trabalho foi demonstrado que o sistema de expressão em bactéria *Roseta Gami* foi eficiente em produzir o inibidor recombinante ryCdcPLI e manter sua atividade inibitória frente a PLA₂s presentes na peçonha de *B. pauloensis*. Assim, a continuidade desse estudo com o aprimoramento das técnicas de expressão e purificação do mesmo, tornará possível a sua obtenção com um maior rendimento e eficácia no seu potencial inibitório, podendo estender nossos estudos para testes que visam demonstrar o seu potencial terapêutico em diferentes doenças cuja patogenia envolva a participação de PLA₂s.

Referências bibliográficas

- ARNI, R.K. & WARD, R.J. **Phospholipase A2 - a structural review**. *Toxicon*, v. 34, 1996, p. 27-41.
- AGUIAR, A. S., MELGAREJO, A. R., ALVES, C. R., GIOVANNI-DE-SIMONE, S., 1997. **Single-step purification of crotopotin and croctactine from *Crotalus durissus terrificus* venom using preparative isoelectric focusing**. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research* 30, 25-28.
- BERNARDE P.S. **Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos no Brasil**. 1 ed. São Paulo, **Anolisbooks**. 224 p. 2014
- BOLDRINI-FRANÇA, J. **Transcriptoma da glândula de peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*: análise do perfil de expressão gênica**. **Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica)** – Instituto de Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia, Minas Gerais, 2008
- BOLDRINI-FRANÇA J, RODRIGUES RS, FONSECA FP, MENALDO DL, FERREIRA FB, HENRIQUE-SILVA F, SOARES AM, HAMAGUCHI A, RODRIGUES VM, OTAVIANO AR, HOMSI-BRANDEBURGO MI. ***Crotalus durissus collilineatus* venom gland transcriptome: analysis of gene expression profile**. *Biochimie*. 2009; 91(5):586-95.
- BRASIL. Ministério da Saúde. **Acidentes por Animais peçonhentos - Serpentes**. Disponível em: < <http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>. Acesso em: 01 jul 2018.
- BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. **Snake venom proteins acting on hemostasis**. *Biochimie* v. 82, p. 851–859, 2000
- BROWN, W. J.; CHAMBERS, K.; DOODY, A. **Phospholipase A2 (PL A2) enzymes in membrane trafficking: mediators of membrane shape and function**. *Traffic*, v.4, n. 4, 2003, p. 214-221.
- BURKE, J. E. & DENNIS, E. A. **Phospholipase A₂ structure/function, mechanism, and signaling**. *Journal of lipid research*, v. 50 Suppl, n. Suppl, 2009, p. 236-242.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. **Phospholipase A2 biochemistry. Cardiovasc Drugs Ther**, v. **23**, n. **1**, p. 49-59, Feb 2009. ISSN 1573-7241 (Electronic) 0920-3206 (Linking).

Disponível em: < <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18931897> >.

CALVETE, J. J., SANZ, L., ANGULO, Y., LOMONTE, B., & GUTIÉRREZ, J. M. **Venoms, venomics, antivenomics**. FEBS Letters, v. 583, n.11, 2009, p. 1736-1743.

CARDOSO, K. C.; DA SILVA, M. J.; COSTA, G. G.; TORRES, T. T.; DEL BEM, L. E.; VIDAL, R. O.; MENOSSI, M.; HYSLOP, S. **A transcriptomic analysis of gene expression in the venom gland of the snake Bothrops alternatus (urutu)**. BMC Genomics, v. 11.2011, p. 605.

CHIOATO L, WARD RJ (2003) **Mapping structural determinants of biological activities in snake venom phospholipases A2 by sequence analysis and site directed mutagenesis**.

Toxicon 42: 869-83.

COSTA, H.C.; BÉRNILS, R.S. 2018. **Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies**. *Herpetologia Brasileira*, 7(1): 11-51.

DE HAAS, G. H.; POSTEMA, N. M.; NIEUWENHUIAEN, W.; VAN DEENEN, L. L. M. **Purification and properties of phospholipase a from porcine pancreas**.

Biochimica et Biophysica Acta, v. 159, 1968, p. 103-117.

DENNIS, E. A. **Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2**. *J. Biol. Chem.* v. 269, 1994, p. 13057-13060.

DENNIS, E. A. & DAVIDSON, F.F. **Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipases A2 from snake venom to human secreted forms**. *J. Mol. Evol.* v. 31, 1990, p. 228-238.

Evol. v. 31, 1990, p. 228-238.

DONNINI S., FINETTI F., FRANCESE S., BOSCARO F., DANI R. F., MASET F., FRASSON R., PALMIERI M., PAZZAGLI M., FILIPPIS V., GARACI E., ZICHE M. **A novel protein from the serum of Python sebae, structurally homologous with type- γ**

phospholipase A2 inhibitor, displays antitumour activity. Biochemical Journal, 2011. v. 440, issue. 2, p. 251-262;

DUNM, K. W. B. **Snake inhibitors of phospholipase A₂ enzymes.** BiochemBiophys. Acta., v. 1533, 2001, p. 29-37.

FAURE, G. **Natural inhibitors of toxic phospholipases A(2).** Biochimie, v. 82, n. 9-10, p. 833-40, Sep-Oct 2000.

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

FORTES-DIAS C.L., JANNOTTI M.L.D., FRANCO F.J.L., MAGALHÃES A, DINIZ C.R. **Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A₂ inhibitor isolated from the blood plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA₂ from *Lachesis mutamuta* snake venom.** Volume 37, Issue 12, December 1999, Pages 1747-1759

FORTES-DIAS, C.L.; LIN, Y.; EWELL, J.; DINIZ, C.R.; LIU, T. **A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*): Protein structure, genomic structure, and mechanism of action.** J. Biol. Chem. v. 269, 1994, p. 15646-15651.

FRANCO, F.L. Origem e Diversidade das Serpentes. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.** São Paulo: Sarvier, 2003, p. 13-32.

GARCIA, F., TOYAMA, M. H., CASTRO, F. R., PROENÇA, P. L., MARANGONI, S., SANTOS, L. M. **Crotapotin induced modification of T lymphocyte proliferative response through interference with PGE₂ synthesis.** Toxicon, n. 42, v. 4, 2003, p. 433-437.

GIMENES, S. N. C. **Caracterização bioquímica e funcional do γ CdcPLI, um inibidor de Fosfolipases A2 isolado no soro de *Crotalusdurissuscollilineatus***. 71 f. Dissertação (Mestrado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), 2013.

GIMENES, S. N. C. et al. **Isolation and biochemical characterization of a γ -type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalusdurissuscollilineatus*snake serum**. *Toxicon*. Volume 81, April 2014, Pages 58–66

GIMENES, S. N. C. **Efeito antitumoral de um inibidor de PLA₂ de *Crotalusdurissuscollilineatus*(γ CdcPLI) pela modulação da via P13K/Akt em células de câncer de mama**. Tese (Doutorado em Genética e Bioquímica) – Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia (MG), 2017, pag 123.

GONZÁLEZ, A., FILLAT, MF. - **Aspectos metodológicos de la expresión de proteínas recombinantes en *Escherichia coli***. *Revista de Educación Bioquímica* 37, 1 (2018), 14-27.

GONZAGA, A. R.M. **Isolamento e caracterização estrutural e biológica de fosfolipases ácidas da peçonha de cascavel (*Crotalus durissus cascavella*)**. Dissertação (mestrado) – Universidade Federal de Pernambuco. Centro de Biociências. *Biologia Animal*, 2017.

GUEDES, T. B.; NOGUEIRA, C.; MARQUES, O. A. V. **Diversity, natural history, and geographic distribution of snakes in the Caatinga, Northeastern Brazil**. *Zootaxa*, 3863(1): 001-093. 2014.

GUTIÉRREZ J.M., CALVETE J.J., HABIB A.G., HARRISON R.A., WILLIAMS D.J., WARRELL D.A. **Snakebite envenoming**. *Nat Rev Dis Primers*. 2017 Sep 14;3:17063. doi: 10.1038/nrdp.2017.63

HAINS P. G.; NIELD B.; SEKULOSKI S.; DUNN R.; BROADY K. **Sequencing and Twodimensional Structure Prediction of a Phospholipase A2 Inhibitor from the Serum of the Common Tiger Snake (*Notechisscutatus*)**. *J. Mol. Biol.*,v. 312, 2001, p. 875-884.

HUNTTON, R. A. & WARREL, D. A. **Action of snake venom components on the haemostaticsystem**. *Haemostasis and thrombosis*.v. 7, 1993, p. 176-189

INOUE, S. SHIMADA, A.; OUKURA, N.; IKEDA, K.; SAMEJIMA, Y.; OMORISATOH, T.; HAYASHI, K. Specificity of two types of phospholipase A2 inhibitors from plasma of venomous snakes. In: **Biochemistry & Molecular Biology International**, v. 41, 1997, p. 529-537.

KAUR, J., KUMAR, A., & KAUR, J. (2018). **Strategies for optimization of heterologous protein expression in E. coli** : Roadblocks and reinforcements. *International Journal of Biological Macromolecules*, 106, 803–822. doi:10.1016/j.ijbiomac.2017.08.080

KINI, R.M. **Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle**. Em: KINI, R.M., (Ed.), *Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Inglaterra, p. 1–28, 1997

KINI, R.M. **Anticoagulant proteins from snake venoms: structure, function and mechanism**. *Biochem. J.* v. 397, n.3, p.377-387, 2006

LAEMMLI, U. K. **Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4**. *Nature*, v.227, 1970, p. 680-689.

LESLIE C.C. **Cytosolic phospholipase A2: Physiological function and role in disease**. *Journal of lipid research*. University of Colorado Denver, v.86, issue 7, 2015. Acesso em: 09 jul, 2018. Disponível em: <<http://www.jlr.org/content/early/2015/04/02/jlr.R057588.abstract>>.

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

MATSUBARA, M. H. **Mecanismos moleculares envolvidos na produção de prostaciclina induzida pela fosfolipase A2 do veneno de *Crotalus durissus terrificus* em células endoteliais: repercussão na atividade anti-inflamatória**. 2015. Tese (Doutorado em Imunologia) – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade de São Paulo (USP), São Paulo.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J.L.C. et al. **Animais Peçonhentos do Brasil; Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, 2003.

MIRANDA, M.E.; COUTURIER, G.A.; CANZIANI, G.A.; SEKI, C; VIDAL, J.C. **Resistencia de *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops neuwiedi* a la neurotoxicidad de cantidades masivas de veneno crotalico**. ActaPhysiol. Latino-Americana v. 32, 1982, p. 33-61.

MORS, W. B. **Plants active against snake bite**. Economic and Medicinal Plante Research, v.5, 1991, p 353-373.

OGA S, CAMARGO MMA, BATISTUZZO JAO. **Fundamentos de toxicologia**. 4ª edição. São Paulo: Atheneu, 2014.

OHKURA, N.; KITAHARA, Y.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYASHI, K. **Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticaudas semifasciata***. J. Biochem.v.125, 1999, p.375-382.

OLIVEIRA, C. Z.; MENALDO, D. L.; MARCUSSI, S.; SANTOS-FILHO, N. A.; SILVEIRA, L. B.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M. **An α -type phospholipase A2 inhibitor from *Bothrops jararacussu* snake plasma: Structural and functional characterization**. In: Biochimie, in press, 2008.

OKUMURA, K.; OHKURA, N.; INOUE, S.; IKEDA, K.; HAYSHI, K. **A novel phospholipase A2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii sineticus*: Sequence homologies with human leucine-rich α 2-glycoprotein**. In: Journal of Biological Chemistry, v. 273, 1998, p. 19.469-19.475.

OVADIA M.; KOCHVA E. **Neutralization of *Viperidae* and *Elapidae* snake venoms by sera of different animals**. Toxicon Volume 15, Issue 6, 1977, Pages 541-547

PERALES J, VILLELA C, DOMONT GB, CHOUMET V, SALIOU B, MOUSSATCHÉ H, BON C, FAURE G. **Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum.** Eur J Biochem. v. 227, 1995, p. 19-26.

PERALES, J. ET AL. **Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum.** Eur J Biochem, v. 227, n. 1-2, p. 19-26, Jan 15 1995.

PINHO, F. M. O. PEREIRA, I. D. **Ofidismo.** Revista da Associação Médica Brasileira, v. 47, n. 1, p. 24-29, 2001.

PYRON, A.R.; BURBRINK, F.T.; WIENS, J.J. **A phylogeny and revised classification of Squamata, including 4161 species of lizards and snakes.** BMC Evolutionary Biology, v.13, p. 3-53, 2013

ROBERTO, P. G.; KASHIMA, S.; SOARES, A. M.; CHIOATO, L.; FAÇA, V. M.; FULY, A. L.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J. O.; FRANÇA, S. C. **Cloning and Expression of an Acidic Platelet Aggregation Inhibitor Phospholipase A2 cDNA from *Bothrops Jararacussu* Venom Gland. Protein Expression and Purification.** v. 37, 2004. p.102-108.

ROCHA, S.L.G., LOMONTE, B., NEVES-FERREIRA, A.G.C., DOMONT, G.B., GUTIERREZ, J.M., PERALES, J., 2002. **Functional analysis of DM64, an antimyotoxic protein with immunoglobulin-like structure from *Didelphis marsupialis* serum.** Eur. J. Biochem. 269, 6052–6062

ROSANO GL, CECCARELLI EA. **Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges.** Front Microbiol. 2014; Published online 2014 Apr 17. doi: 10.3389/fmicb.2014.00172 Recovered in 01 July 2018 via <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4029002/>

SAMPAIO, S. C.; HYSLOP, S.; FONTES, M. R.; PRADO-FRANCESCHI, J.; ZAMBELLI, V. O.; MAGRO, A. J. et. al. **Crotoxin: novel activities for a classic beta-neurotoxin.** Toxicon, v. 55, 2010, p. 1045-1060.

SCHMIDT, F. **Recombinant expression systems in the pharmaceutical industry**. Applied microbiology and biotechnology, 2004; 65(4): 363-72

SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO PARANÁ. (Ofídios) Acidente Crotálico. In: **Site Institucional da Secretaria de Saúde do Estado do Paraná**. Recuperado em 29 de junho de 2018 a partir de <http://www.saude.pr.gov.br/modules/conteudo/conteudo.php?conteudo=1462>

SANTORO ML, SOUSA-E-SILVA MCC, GONÇALVES LRC, ALMEIDA-SANTOS SM, CARDOSO DF, LAPORTA-FERREIRO LI, ET AL. **Comparison of the biological activities in venoms from three subspecies of South-American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus***. Comp Biochem Physiol 1999;122C:61–73.

SANTOS-FILHO, N.A., BOLDRINI-FRANÇA, J., SANTOS-SILVA, L.K., MENALDO, D.L., HENRIQUE-SILVA, F., SOUSA, 156 T.S., CINTRA, A.C., MAMEDE, C.C., OLIVEIRA, F., ARANTES, E.C., GREGGI ANTUNES, L.M., CILLI, E.M., 157 SAMPAIO, S.V., 2014. **Heterologous expression and biochemical and functional characterization of a 158 recombinant alpha-type myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake**. Biochimie 105, 119-128.

SILVA, J. G. **Estudo dos efeitos do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre o metabolismo e estresse oxidativo em fígado de ratos**. 52f. Dissertação (Mestrado em Farmacologia) – Universidade Federal do Paraná (UFPR), Curitiba, 2009.

SILVA JÚNIOR, N.J. (org). 2016. **As cobras-corais do Brasil: biologia, taxonomia, venenos e envenenamentos**. 1ª Ed. PUC. Goiás 415

SINAN- **Sistema de informação de agravos de notificação. Casos de acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2018*** Recuperado em 2019 a partir <http://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/junho/05/16-Dados-Epidemiologicos-SiteSVS--maio-2019---OFIDISMO-CASOS.pdf>

SLAVENKO, ALEX, ET AL. "Global patterns of body size evolution in squamate reptiles are not driven by climate." *Global Ecology and Biogeography* 28.4 (2019): 471-483.

SWARTZ, J.R. **Advances in Escherichia coli production of therapeutic proteins.** Current Opinion in Biotechnology, 2001; 12(2):195-201

TEIXEIRA C.F., LANDUCCI E.C., ANTUNES E., CHACUR M., CURY Y. **Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2.** Toxicon. 2003. Recuperado em 1 Jul 2018 a partir de <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15019493>

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

UETZ, P., FREED, P. & HOŠEK, J. (EDS.) (2019) **The Reptile Database**, <http://www.reptile-database.org>, accessed Jun/2018

VELLE, A. L; BRITES, V.L.C. **Ecologia e nomes populares de Crotalus durissus collilineatus (Amaral, 1926) em áreas sob efeito antrópico do Triângulo e Alto Paranaíba, Minas Gerais.** Revista Brasileira de Zootecias v.14, n.1,2,3, p.71-79, 2012

WARREL, D. A. **Snakebite.** Lancet, v. 375, p. 77-88, 2010.

WALLACH, V.; KENNETH, L. W., BOUNDY, J. **Snakes of the World: A Catalogue of Living and Extinct Species.** Taylor and Francis, CRC Press, 2014.

YAMAGUCHI, HIROSHI, AND MASAYA MIYAZAKI. "Refolding techniques for recovering biologically active recombinant proteins from inclusion bodies." *Biomolecules* vol. 4,1 235-51. 20 Feb. 2014, doi:10.3390/biom4010235