

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS

STEPHANIE AKEMI FUNAGOSHI

Identificação e separação de fosfolipases da peçonha de *Bothrops alternatus* com potencial antiparasitário e antitumoral

Uberlândia

2024

STEPHANIE AKEMI FUNAGOSHI

Identificação e separação de fosfolipases da peçonha de *Bothrops alternatus* com potencial antiparasitário e antitumoral

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Carla Cristine Neves Mamede

Uberlândia

2024

STEPHANIE AKEMI FUNAGOSHI

Identificação e separação de fosfolipases da peçonha de *Bothrops alternatus* com potencial antiparasitário e antitumoral

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial para obtenção do título de bacharel em Biomedicina

Uberlândia, 12 de abril de 2024

Banca Examinadora:

Prof.^a Dr.^a Carla Cristine Neves Mamede - Presidente da Banca (UFU)

Prof.^a Dr.^a Carine Firmino Carvalho Roel (UFU)

Prof.^a. Dr.^a Júnia de Oliveira Costa (IFTM)

F979 Funagoshi, Stephanie Akemi, 2000-
2024 Identificação e separação de fosfolipases da peçonha
de *Bothrops alternatus* com potencial antiparasitário e
antitumoral [recurso eletrônico] / Stephanie Akemi
Funagoshi. - 2024.

Orientadora: Carla Cristine Neves Mamede.
Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Uberlândia, Graduação em
Biomedicina.

Modo de acesso: Internet.

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Ciências médicas. I. Mamede, Carla Cristine Neves,
1986-, (Orient.). II. Universidade Federal de
Uberlândia. Graduação em Biomedicina. III. Título.

CDU: 61

Este trabalho foi planejado e executado pensando que algo pequeno poderia mudar o mundo. Eu o dedico a todos aqueles, que em algum momento, possam ser auxiliados por ele.

AGRADECIMENTOS

Ao meu pai, que sempre me incentivou a continuar, me apoiou em todas minhas escolhas e esteve presente da maneira que pôde. O seu amor, conselhos sempre me impulsionaram a ser o melhor que eu poderia. O final deste capítulo só foi possível por sua causa, sinto saudades.

À Prof.^a Carla Cristine Neves Mamede, por ter me oferecido esta oportunidade e apesar de todas as intercorrências e dificuldades nunca deixou de me orientar. As experiências e possibilidades que este trabalho me proporcionou são uma das coisas mais preciosas que eu poderia possuir. Aos meus amigos, sejam da graduação, do cheerleading ou de outras experiências e, em especial, aqueles que sempre se fizeram presentes mesmo quando eu estava perdida. Obrigada por não desistirem de mim, principalmente nos momentos em que eu havia desistido.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo financiamento, que permitiu que este projeto fosse realizado.

À Universidade Federal de Uberlândia, por abrir as portas para o futuro.

*“Nada na vida deve ser temido,
somente compreendido. Agora é
hora de compreender mais para
temer menos.”*

- Marie Curie

RESUMO

Introdução: As peçonhas ofídicas são misturas complexas de moléculas com ações diversas. Sua composição possui compostos como proteínas, enzimas, peptídeos e outros compostos orgânicos e inorgânicos. Espécies do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos registrados e possuem um arsenal de biotoxinas, como fosfolipases, que são proteínas de baixo peso molecular, caracterizadas pela ação enzimática sobre fosfolipídios de membrana. A pesquisa de compostos terapêuticos de origem natural vem chamando atenção nos últimos anos, evidenciando a necessidade de estudos para isolamento de toxinas ofídicas e prospecção de novos medicamentos. **Objetivo:** Identificar e isolar proteínas com potencial antiparasitário e/ou anticâncer da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*. **Métodos:** Para identificar proteínas com potencial terapêutico de *B. alternatus* foi realizada uma pesquisa bibliográfica em bases de dados do PubMed e Portal CAPES, seguindo o método PRISMA. Foi realizado o fracionamento da peçonha bruta e purificação de proteínas de interesse por cromatografia líquida. A massa molecular das proteínas isoladas foi analisada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes. A atividade fosfolipásica foi realizada através de ensaio de verificação de hidrólise de fosfolipídios presentes na gema de ovo de galinha. **Resultados:** A pesquisa em base de dados resultou 210 artigos, dos quais 15 artigos foram analisados detalhadamente. A triagem resultou em 7 apresentavam proteínas com potencial antitumoral e 3 apresentavam proteínas com potencial antiparasitário, antiviral ou antimicrobiano na peçonha da *B. alternatus*. O fracionamento da peçonha bruta resultou em 6 frações principais, A1-A6, sendo que nas frações A4 e A5 foi possível identificar a presença de proteínas com massa molecular menor que 30 kDa e com atividade fosfolipásica, indicando a presença de PLA₂. Com base nestes resultados, estas frações foram submetidas a cromatografias de interação hidrofóbica. A cromatografia da fração A4 resultou em 3 subfrações, A4a-A4c e apresentou separação de proteínas de baixo peso molecular na subfração A4c, porém, com baixo rendimento proteico. A cromatografia da fração A5 resultou em 7 subfrações, A5a-A5g, sendo identificado na subfração A5g componentes proteicos com características similares à fosfolipase BaltPLA₂, uma fosfolipase de *B. alternatus* com potencial antiviral contra dengue. **Conclusões:** A peçonha da serpente de *B. alternatus* contém vários componentes bioativos, especialmente enzimas com efeitos antiparasitário, antimicrobiano e/ou antitumoral. Os métodos de purificação desenvolvidos neste trabalho permitiram a obtenção de frações relevantes com atividade enzimática, porém, com baixo rendimento proteico. Metodologias mais refinadas devem ser empregadas no intuito de obter uma purificação com rendimento e grau de pureza mais elevado, indicando que novos estudos são necessários.

Palavras-chave: Serpentes, Toxinas, Purificação.

ABSTRACT

Introduction: Snake venoms are complex mixtures of molecules with diverse actions. Its composition has compounds such as proteins, enzymes, peptides and other organic and inorganic compounds. Species of the genus *Bothrops* are responsible for most of the snakebites recorded and have an arsenal of biotoxins, such as phospholipases, which are low molecular weight proteins, characterized by their enzymatic action on membrane phospholipids. Research into therapeutic compounds of natural origin has been drawing attention in recent years, highlighting the need for studies to isolate snakebite toxins and prospect for new drugs.

Objective: To identify and isolate proteins with antiparasitic and/or anticancer potential from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Methods:** To identify proteins with therapeutic potential of *B. alternatus*, a bibliographic search was carried out in PubMed and CAPES databases, following the PRISMA method. Fractionation of the crude venom and purification of proteins of interest by liquid chromatography were performed. The molecular mass of the isolated proteins was analyzed by polyacrylamide gel electrophoresis under denaturing conditions. The phospholipase activity was carried out through a hydrolysis assay of phospholipids present in the chicken egg yolk. **Results:** The database search resulted in 210 articles, of which 15 articles were analyzed in detail. Screening resulted in 7 proteins with antitumor potential and 3 had proteins with antiparasitic, antiviral or antimicrobial potential in the venom of *B. alternatus*. The fractionation of the crude venom resulted in 6 main fractions, A1-A6, and in fractions A4 and A5 it was possible to identify the presence of proteins with molecular weight less than 30 kDa and with phospholipase activity, indicating the presence of PLA2. Based on these results, these fractions were submitted to hydrophobic interaction chromatography. The chromatography of the A4 fraction resulted in 3 subfractions, A4a-A4c and showed separation of low molecular weight proteins in the A4c subfraction, but with low protein yield. Chromatography of the A5 fraction resulted in 7 subfractions, A5a-A5g, and protein components with similar characteristics to BaltPLA2 phospholipase, a phospholipase of *B. alternatus* with antiviral potential against dengue, were identified in the A5g subfraction. **Conclusions:** The venom of the *B. alternatus* snake contains several bioactive components, especially enzymes with antiparasitic, antimicrobial and/or antitumor effects. The purification methods developed in this work allowed the obtaining of relevant fractions with enzymatic activity, but with low protein yield. More refined methodologies should be employed in order to obtain a purification with a higher yield and degree of purity, indicating that further studies are needed.

Keywords: Snakes, Toxins, Purification.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Níveis de toxinas no veneno de viperídeos e elapídeos	10
Figura 2	Composição da peçonha de <i>B. alternatus</i>	13
Figura 3	Fluxograma PRISMA da pesquisa bibliográfica	22
Figura 4	Fracionamento da peçonha bruta de <i>B. alternatus</i>	22
Figura 5	SDS-PAGE a 14% das frações obtidas a partir da peçonha bruta de <i>B. alternatus</i>	23
Figura 6	Atividade fosfolipásica das frações de <i>B. alternatus</i> (50µg/25µL)	23
Figura 7	Purificação da fração A4 de <i>B. alternatus</i>	24
Figura 8	Purificação da fração A5 de <i>B. alternatus</i>	25
Figura 9	Atividade fosfolipásica da fração A5 de <i>B. alternatus</i> e subfrações (50µg/25µL)	26

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Toxinas de <i>B. alternatus</i> com potencial antiparasitário e/ou antitumoral	20
Tabela 2	Rendimento proteico das frações e subfrações da peçonha de <i>B. alternatus</i>	26

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

3FTX	Toxinas Three Finger
ADAMS	Desintegrinas e metaloproteases
AMBIC	Bicarbonato de amônia
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CRISP	Proteína secretora rica em cisteína
CTL	Proteínas semelhantes a Lectina tipo-C
DEAE	Dietilaminoetil
DES	Desintegrina
DTT	Dithiothreitol
FPLC	Fast-performance liquid chromatography
LAAO	L-Aminoácido-oxidases
PBS	Tampão fosfato-salino
PLA ₂	Fosfolipase A2
PL	Fosfolipase
PRISMA	Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analysys
SDS-	Eletoforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes
PAGE	
SNACLES	Proteínas semelhantes a Lectina tipo-C
SVMP	Metaloproteases/metaloproteinases
SVSP	Serinoproteases/serinoproteinases
Tris HCl	Tampão tris – Tris(hidroximetil) aminometano cloreto de sódio

SUMÁRIO

Sumário

1 INTRODUÇÃO.....	10
2 OBJETIVOS.....	15
2.1 Objetivo geral.....	15
2.2 Objetivos Específicos	15
3 METODOLOGIA	15
3.1 Pesquisa bibliográfica.....	15
3.2 Fracionamento da peçonha de <i>Bothrops alternatus</i>	15
3.3 Caracterização bioquímica	16
3.3.1 Determinação da Composição e Concentração Proteica	16
3.3.2 Determinação da Massa Molecular de Proteínas	16
3.3.3 Atividade enzimática	16
4 RESULTADOS E DISCUSSÃO.....	17
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	26

1 INTRODUÇÃO

Peçonhas de serpentes causam diversos efeitos fisiopatológicos decorrentes da ação das toxinas que contêm, com sua composição podendo variar conforme idade, gênero, nicho ecológico e outras condições do animal.

Nas peçonhas ofídicas são identificadas uma grande variedade de compostos proteicos, que apresentam múltiplas ações biológicas (Caswell et al., 2020). Somente nas famílias Elapidae e Viperidae já foram identificadas cerca de 25 mil toxinas, sendo elas proteínas com e sem ação enzimática e peptídeos bioativos, e apenas uma pequena parcela foi devidamente caracterizada (Waheed et al, 2017; Rao et al., 2022).

De acordo com a perspectiva da evolução, a peçonha ofídica é um conjunto amplo de componentes extremamente variados – abrangendo enzimas, íons, aminoácidos dentre outros, aproximadamente, 95% de seu peso total são proteínas e peptídeos com ação complexa. Os compostos proteicos mais abundantes encontrados englobam fosfolipases A₂ (PLA₂), metaloproteases (SVMP), serinoproteases (SVSP), toxinas three finger (3FTx), L-aminoácido oxidases (LAAO), desintegrinas (DES), proteína secretora rica em cisteína (CRiSP), proteínas semelhantes a lectinas tipo C (CTL/SNACLES) e peptídeos (Kang et al., 2011; Tasoulis et al., 2022). Como representado na figura 1, a grande diversidade de toxinas confere à peçonha, por sua vez, inúmeros efeitos biológicos, como: citotoxicidade, miotoxicidade, neurotoxicidade, atividades anti ou pró-coagulantes (Gutiérrez et al., 2017; Ferraz et al., 2019).

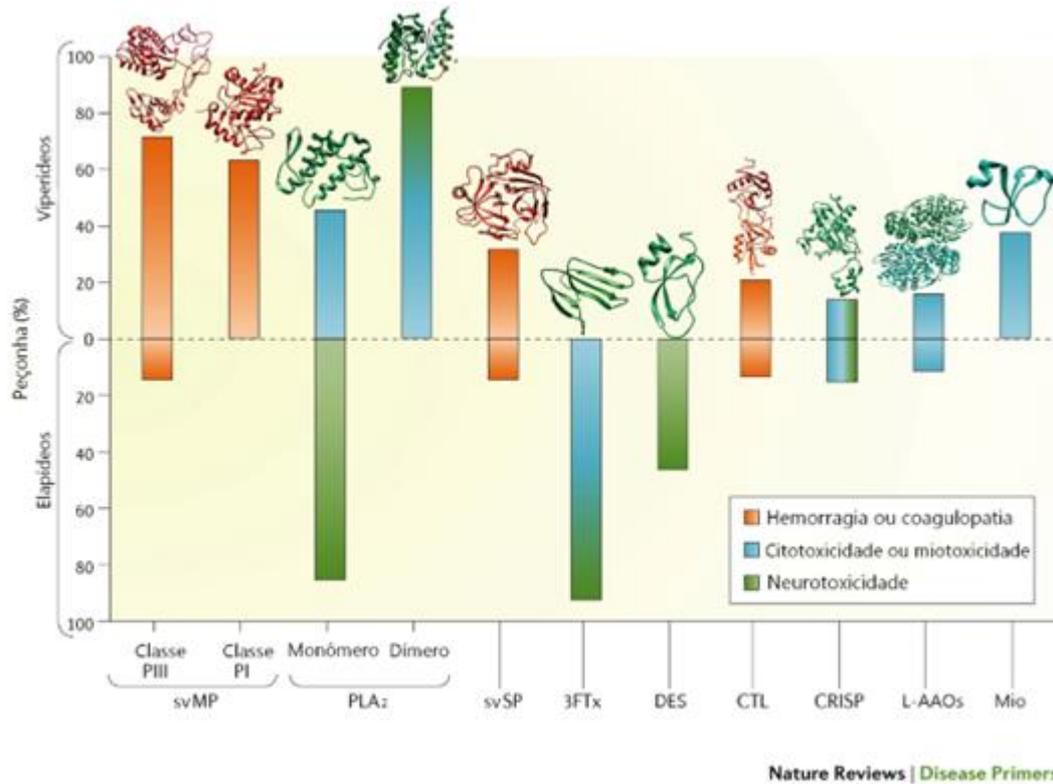


Figura 1: Níveis de toxinas na peçonha de viperídeos e elapídeos. A figura evidencia os níveis de proteína – em % do proteoma total da peçonha – e a distribuição das famílias de toxinas mais abundantes nas famílias Viperidae e Elapidae, sendo elas as metaloproteínas de classe III e I, (svMP), fosfolipases A2 (PLA₂), serinoproteínas (svSP), toxinas three-finger (3FTx), proteínas semelhantes a lectinas tipo C (CTL), proteínas secretoras ricas em cisteína (CRISP), L-aminoácido oxidases (L-AAOs) e miotoxinas (Mio). As cores presentes nas barras indicam o tipo de atividade biológica mais relevante presente na toxina, sendo que o gradiente de cor indica a relação dose-efeito (mesma cor) ou efeitos diferentes (múltiplas cores) indicando que algumas toxinas são capazes de causar um efeito em doses baixas e outro efeito em doses altas. Adaptado Gutiérrez et al. (2017).

No Brasil, existe uma diversidade de serpentes peçonhentas e as espécies do gênero *Bothrops* têm grande relevância epidemiológica, pois são responsáveis por mais de 70% dos casos de acidentes ofídicos notificados ao Ministério da Saúde (Brasil, 2022).

As principais toxinas presentes em peçonhas botrópicas são classificadas como serinoproteases (SVSPs), metaloproteases (SVMPs), fosfolipases A2 (PLA₂), L-aminoácido-oxidases (LAAOs) e proteínas diversas como proteínas semelhantes a lectinas tipo-C (CTL/SNACLES) e desintegrinas (DES). Tais compostos são responsáveis pelos efeitos característicos do envenenamento botrópico (Queiroz et al., 2008; Campos et al., 2013).

A peçonha da serpente *B. alternatus*, uma espécie de serpente comum no Brasil conhecida como Urutu, contém predominantemente, metaloproteases (SVMPs – 52,2 %), que são as principais responsáveis pelos efeitos hemorrágicos do envenenamento (Rocha e Furtado, 2005; Mamede et al., 2020; Sousa et al., 2013) (figura 2). As SVMPs são enzimas de ação proteolítica zinco-dependente, agrupadas com as ADAMS – desintegrinas e metaloproteases (Takeda, 2016). Estas proteases são classificadas em 3 classes, baseadas na composição de seus domínios e tamanho, sendo as PI com domínio metaloprotease, variando de 20-30 kDa; PII, com domínio desintegrina, variando de 30-60 kDa e PIII, com domínios metaloproteases; tipo desintegrina e tipo cisteína, variando de 60-100 kDa (Markland Jr. E Sewnson, 2012; Gutiérrez et al., 2016).

Outras proteínas também são abundantes na peçonha de *B. alternatus* e contribuem para os efeitos hemostáticos, citotóxicos e inflamatórios da peçonha, tais como: serinoproteases (SVSPs – 5,8 %), fosfolipases (PLA₂ – 4,4%), L-aminoácido-oxidases (LAAOs – 14,9%) e proteínas semelhantes a lectinas tipo-C (CTL – 14,8 %) (Souza et al., 2013; Mamede et al., 2020; Takayasu et al., 2023) (figura 2).

As SVSPs são enzimas peptidases pertencentes a família das tripsinas e conhecidas principalmente por seus efeitos sobre a cascata de coagulação - em específico, ao sistema fibrinolítico e ao sistema caliceína-cinina. (Paes Leme et al., 2008). Seu mecanismo de ação envolve a ação catalítica de um complexo enzimático de resíduos reativos de serina estabilizados por histidina e ácido aspártico em seu sítio ativo. Essas enzimas são capazes de atuar em sistemas da regulação da homeostase, interferindo nas vias intracelulares e nos processos da angiogênese (Serrano, 2013; Bhat et al., 2016).

As PLA₂, proteínas de baixo peso molecular (14-16 kDa), são tipicamente caracterizadas pela ação enzimática sobre fosfolipídios de membrana. Seu mecanismo de ação envolve a aceleração do movimento de *turnover* dos fosfolipídios de membrana por meio da hidrólise da ligação 2- acil-éster de 3-sn-fosfolipídeos – liberando assim os ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico, que modulam funções celulares importantes associados a proliferação celular e angiogênese (Costa et al., 2008; Suranse et al., 2022). Estas proteínas são componentes abundantes na peçonha de diversas espécies de serpentes brasileiras e apresentam uma diversidade de efeitos relacionados à sua ação citotóxica e por isso podem ser amplamente exploradas para aplicação como agentes antimicrobianos, antiplaquetários, antitumorais, entre outras ações (Vonk et al. 2011; Chan et al., 2016; Estevão-Costa et al., 2018).

As LAAOs são tipos de flavoenzimas, classificadas como oxidoreduases homodiméricas, com massa molecular aproximada variável dependendo das condições de análise – sendo 110-150 kDa em condições não desnaturantes e 50-70 kDa em condições desnaturantes (Du e Clemetson, 2002). Seu mecanismo de ação envolve a catalização da desaminação oxidativa de L-aminoácidos em ácido alfa-cetoglutarico, com produção de amônia e peróxido de hidrogênio (Izidoro et al., 2014).

As CTL, ou SNACLES, são moléculas proteicas não dependentes de cálcio e sem atividade enzimática, podendo apresentar tanto potencial pró ou anticoagulante ou até mesmo participar nos processos de adesão celular e endocitose. Estas proteínas têm seu nome derivado de sua semelhança às lectinas tipo C devido à alta homologia de seu domínio de reconhecimento de carboidratos com as lectinas tipo C – contudo, esta função tem se perdido (Arlinghaus e Eble, 2012; Ning et al., 2020).

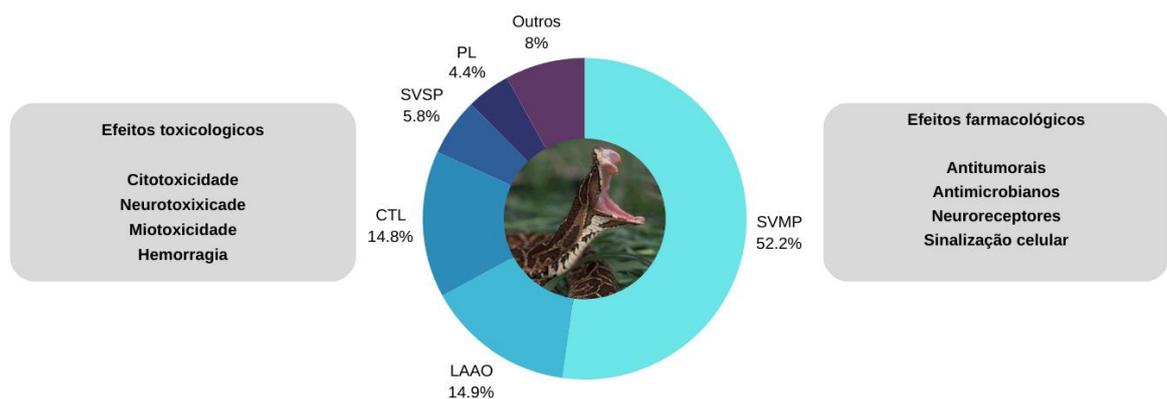


Figura 2: Composição da peçonha de *B. alternatus*. Os principais componentes presentes são responsáveis pelos efeitos de distúrbios hemorrágicos e inflamação. Além de sua participação nos efeitos causados pelo envenenamento botrópico, estes componentes podem apresentar efeitos biológicos de grande utilidade para prospecção de novos compostos farmacológicos. Legenda: SVMPs – Metaloproteinases; LAAOs – L-aminoácido-oxidases; CTL – proteínas semelhantes a lectinas tipo C; SVSPs – Serinoproteinases; PL – Fosfolipases; Outros – Peptídeos diversos. Adaptado Souza et al., (2013) e Mamede et al.,(2020). Fonte: Google imagens.

As peçonhas botrópicas são muito estudadas quanto ao potencial terapêutico de seus componentes. Para melhor caracterização e investigação dos mecanismos de ação e potencial terapêutico das toxinas ofídicas, a purificação de compostos proteicos das peçonhas de serpentes vem sendo aprimorada ao longo das décadas, resultando em procedimentos

combinados, como cromatografias líquidas de alta performance, eletroforese em gel de poliacrilamida e espectrofotometria (Bolt, 2021; Tasoulis e Isbister, 2017).

A partir da análise estrutural e funcional das proteínas isoladas de peçonhas ofídicas é possível desenvolver ferramentas moleculares e biofármacos que podem ser empregados em diversos ramos da ciência e medicina, colaborando para que novas estratégias terapêuticas possam ser formuladas (Gutiérrez e Lomonte, 2013). Atualmente no mercado existem exemplos bem-sucedidos da utilização de toxinas isoladas para o *design* de novos medicamentos. Por exemplo, o Captopril®, medicamento hipotensor derivado de um peptídeo da peçonha da *B. jararaca* e o Eptifibatide®, um peptídeo sintético derivado de uma desintegrina da peçonha de *Sistrurus miliaris barbouri* utilizado para tratamento de doença coronária aguda e na prevenção de ataques cardíacos (El-Aziz et al., 2019; Oliveira et al., 2022).

De acordo com a literatura, cerca de um terço dos fármacos mais vendidos no mundo vem de origem natural, sejam de plantas, microrganismos ou animais. O potencial farmacológico de recursos naturais, como toxinas ofídicas, são grandes motivadores de pesquisas biomédicas de identificação, caracterização e aplicação desses produtos como ferramentas moleculares e biofármacos, empregados em diversos ramos da ciência, bem como no estudo, diagnóstico e tratamento de neoplasias e parasitoses. A fim de explorar o potencial terapêutico de componentes de origem natural são necessárias purificações e caracterizações prévias dessas biomoléculas (Calixto, 2019).

Muitos trabalhos sobre toxinas botrópicas são publicados, a BnSP, uma PLA₂ purificada da peçonha de *B. pauloensis*, exerceu efeitos antiparasitários contra a toxoplasmose e a BmajPLA₂-II, isolada da peçonha de *B. marajoensis*, teve o mesmo efeito contra parasitos causadores de doença de Chagas, leishmaniose e malária (Borges et al., 2016; Grabner et al., 2017). A BnSP-6 – uma PLA₂ isolada de *B. pauloensis*, induziu apoptose em uma linhagem de células de câncer de mama; a Alternagin ALT-C, uma serinoprotease de *B. alternatus*, impediu a invasão de células tumorais mediada por colágeno em células de carcinoma de ovário (Azevedo et al., 2016; Burin et al., 2020).

As serpentes brasileiras do gênero *Bothrops* possuem relevância clínica e biomédica devido aos diversos efeitos tóxicos e potencial terapêutico dos componentes de suas peçonhas (Rocha e Furtado, 2005; Mamede et al., 2016). Estudos indicam que toxinas botrópicas têm atividade antiparasitária e são estudadas para aplicação como agente antitumoral, no entanto,

mais pesquisas são necessárias para aprimorar as estratégias de purificação e de investigação da ação biológica, terapêutica e farmacológica dessas biomoléculas.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Identificar e isolar proteínas com potencial antiparasitário e/ou anticâncer da peçonha da serpente *Bothrops alternatus*.

2.2 Objetivos Específicos

1. Identificar na literatura científica proteínas isoladas da peçonha de *B. alternatus* que apresentem efeito antiparasitário e/ou antitumoral.
2. Fracionar a peçonha de *B. alternatus*, identificar e isolar proteínas já descritas na literatura.
3. Caracterizar parcialmente o perfil bioquímico das proteínas isoladas.

3 METODOLOGIA

3.1 Pesquisa bibliográfica

Para identificar proteínas de *B. alternatus* com potencial terapêutico foi realizada revisão sistemática de literatura seguindo o método *Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses* (PRISMA). A pesquisa bibliográfica foi feita em bases de dados do Pubmed e do Portal de Periódicos da CAPES, usando as palavras-chave: (*Bothrops* OR *Rhinocerothis*) AND (*alternatus*) AND (antitumoral OR anticancer OR antiparasitic OR antimicrobial OR potential).

Após a realização do levantamento, o material foi selecionado com base em critérios pré-definidos, como: tipo de publicação, assunto e relevância. Dentre os materiais selecionados, foram analisados artigos de pesquisa e de revisão, revisados por pares, publicados nos últimos 20 anos em inglês, espanhol ou português. Os dados foram sumarizados em tabelas com a descrição de testes *in vivo* e *in vitro*, aplicações clínicas, etapas de purificação e mecanismo de ação das toxinas de *B. alternatus*.

3.2 Fracionamento da peçonha de *Bothrops alternatus*

A peçonha bruta cristalizada de *B. alternatus* (574 mg), adquirida do serpentário de Batatais/SP (lote 2009), foi diluída em tampão bicarbonato de amônia (AMBIC 0,05 M, pH 7,8), centrifugada a 10000xg por 10 minutos e o sobrenadante foi aplicado em coluna de cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel - 2,5 x 20 cm). A amostra foi eluída em

gradiente crescente de AMBIC (0,05 M – 1 M), a um fluxo de 20mL/hora e foram coletadas frações de 3 mL (Dias et al., 2018, Mamede et al, 2022).

As frações resultantes (A1-A6) foram analisadas quanto a composição proteica e atividade enzimática. As frações que continham proteínas de baixo peso molecular e ação fosfolipásica (A4-A5) foram submetidas a cromatografias de interação hidrofóbica para purificação. Utilizando a resina Phenyl-Sepharose (1.5 x 2.5 cm).

A fração A5 foi eluída em gradiente decrescente de cloreto de sódio (NaCl 4 M – 0 M) diluído em Tris HCl (0,01 M, pH 8,5), a um fluxo de 20mL/hora e foram coletadas frações de 3 mL. Utilizando um equipamento de cromatografia líquida de rápida eficiência (do inglês *Fast-performance liquid chromatography* – FPLC - AktaPurifier – GE Healthcare).

A fração A4 foi aplicada em resina Butyl-Sepharose (HiTrap Butyl-S FF - 1 mL) e eluída em gradiente decrescente de cloreto de sódio (NaCl 4 M – 0 M) diluído em Tris HCl (0,01 M, pH 8,5), a um fluxo de 1mL/min e foram coletadas frações de 1 mL. Para confirmação da purificação da proteína de interesse, as frações coletadas também foram analisadas quanto a composição e atividade enzimática.

3.3 Caracterização bioquímica

3.3.1 Determinação da Composição e Concentração Proteica

Para dosagem proteica da peçonha bruta e das frações resultantes dos procedimentos cromatográficos foi utilizado o método Ultravioleta ($\lambda = 280\text{nm}$) do espectrofotômetro BioSpec-Mini (Shimadzu Biotech) (Layne, 1957).

3.3.2 Determinação da Massa Molecular de Proteínas

A massa molecular das toxinas isoladas foi estimada por eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes (SDS-PAGE a 14%), sob condições redutoras e não redutoras, na presença e ausência de dithiothreitol (DTT), respectivamente (Lamemmlli, 1970.)

3.3.3 Atividade enzimática

A peçonha e as frações obtidas foram caracterizadas quanto a ação enzimática sobre substrato de origem lipídica. A atividade fosfolipásica foi realizada através de ensaios

enzimáticos que verificam a hidrólise de fosfolipídios presentes na gema de ovo de galinha (adaptado de Soares et al., 1998).

Foi preparada solução de agarose 1% em tampão bicarbonato de sódio (PBS) com Cloreto de Cálcio (CaCl_2), gema de ovo e azida sódica. Esta mistura foi distribuída em placa de vidro com 20 moldes para criação dos poços (orifícios) para aplicação das amostras.

Após a solidificação da placa, as amostras foram aplicadas e mantidas em temperatura ambiente por 48 horas.

Água destilada foi utilizada como controle negativo e a peçonha bruta de *B. alternatus* e a fração A5 foram utilizadas como controle positivo.

4 RESULTADOS E DISCUSSÃO

Inicialmente, foram identificados 210 artigos, dos quais somente 15 foram analisados detalhadamente (figura 3). Foram identificadas na peçonha da serpente de *B. alternatus* 9 proteínas isoladas com potencial antiparasitário e/ou antitumoral. A pesquisa bibliográfica foi realizada conforme protocolo PRISMA em 28/02/2024.

Foram identificadas 7 proteínas de *B. alternatus* com possível aplicação no diagnóstico e tratamento de câncer – Alternagin ALT-C, BaG, Baltergin, BaltDC, Balt-LAAO-II e DisBa-01 – e 3 proteínas aplicadas ao estudo de doenças causadas por microrganismos, sejam vírus, bactérias ou parasitos - BaltPLA₂, BaltTX-I, Balt-LAAO-I (tabela 1) (Souza et al., 2000; Cominetti et al., 2003; Stabéli et al., 2004; Selistre de Araujo et al, 2005; Ramos et al., 2007; Setúbal et al., 2012; Ribeiro et al., 2016; Vieira et al., 2016; Bustillo et al., 2017; Matias et al., 2017; Rabelo et al., 2019; Santos et al., 2020; Dias et al., 2018, 2023; Heleno et al., 2020).

Dentre os trabalhos analisados, a toxina BaltPLA₂ destacou-se devido ao potencial terapêutico antitumorais independentes de atividades catalíticas e muito associadas a citotoxicidade e indução de apoptose provocada por estas enzimas, além de sua interação com o endotélio vascular e pela facilidade de obtenção da proteína, pois são necessárias apenas duas etapas cromatográficas para completa purificação e previamente isolada pelo grupo de pesquisa do laboratório (Dias et al., 2018).

A cromatografia de troca iônica resultou em 6 frações principais (A1-A6), conforme apresentado no cromatograma (figura 4). Em SDS-PAGE foi possível identificar proteínas menores que 30 kDa, nas frações A3, A4 e A5 (figuras 5). A ação fosfolipásica foi confirmada pela formação de halos translúcidos ao redor do local de aplicação das amostras, após 48 horas

de incubação à temperatura ambiente, indicando que as frações A3 (40 mm), A4, A5 (aproximadamente 70 mm) e A6 (60 mm) apresentaram maior atividade (figura 6).

A partir do fracionamento e caracterização inicial da peçonha bruta, foi possível identificar nas frações A4 e A5 a presença de proteínas com massa molecular menor que 30 kDa e com atividade fosfolipásica, indicando a presença de PLA₂. Portanto, as frações A4 e A5 foram submetidas a novas cromatografias de interação hidrofóbica do tipo Butyl e Phenyl-Sepharose, respectivamente.

A cromatografia de 28 mg da fração A4 resultou em 3 frações principais (A4a, A4b e A4c) (figura 7), sendo possível observar a separação de proteínas de baixo peso molecular na fração A4c (figura 8). No entanto, este procedimento apresentou um baixo rendimento proteico, impossibilitando a continuidade dos testes com as subfrações de A4 (tabela 2).

A purificação da fração A5 resultou em 7 subfrações principais (A5a - A5g) (figura 9). A subfração A5g apresentou perfil proteico quando analisada em SDS-PAGE (figura 10). Apesar de não serem visíveis por eletroforese – provavelmente por uma baixa concentração proteica na amostra – várias subfrações de A5 apresentaram atividade fosfolipásica (figura 11).

As subfrações A5a, A5d e A5f induziram a formação de um halo de 40 mm de diâmetro, pouco menor que a peçonha bruta de *B. alternatus* (50 mm) e a fração A5 (55 mm). Enquanto as subfrações A5b e A5g apresentaram halos maiores, com 70 mm de diâmetro, o que indica que estas frações contêm proteínas com potente ação fosfolipásica. A partir da análise destes resultados, podemos evidenciar a separação de proteínas menores que 30 kDa e com potente ação fosfolipásica na subfração A5g. No entanto, esta fração corresponde a apenas 0,3% da composição proteica da peçonha bruta (tabela 2)

Considerando as características bioquímicas, relacionadas à massa molecular e ação enzimática, podemos indicar que a subfração A5g contém proteínas com características similares à toxina BaltPLA₂, purificada previamente por Dias e colaboradores.

A BaltPLA₂ é uma fosfolipases A₂ de caráter ácido e cataliticamente ativa, com massa molecular de aproximadamente 17 kDa.

Ela apresenta uma única cadeia polipeptídica e possui diversas ações biológicas de interesse, em especial sua capacidade de inibir agregação plaquetária – por sua capacidade de clivagem de fosfolipídeos e liberação de ácido araquidônico, que pode ser explorado para o tratamento de patologias de hipercoagulação (Dias et al, 2018).

Além disto, apresenta um perfil pró-inflamatório – a expressão das fosfolipases em doenças inflamatórias sugerem um papel relevante destas enzimas em processos cancerígenos e abre uma gama de possibilidades para o uso de suas estruturas moleculares para a fabricação de compostos sintéticos que sejam úteis para desenvolver novas terapias antitumorais ou tratamentos adjuvantes que amplifiquem os resultados obtidos por métodos mais tradicionais – além de demonstrar potencial antiviral, aumentando a viabilidade celular (Rodrigues et al., 2009; Dias, et al., 2018 e 2023).

Com base em suas características, é possível que esta toxina apresente efeitos farmacológicos antitumorais atuando principalmente na angiogênese, uma vez que o mecanismo de ação das fosfolipases A2 (PLA2) envolvem a aceleração do movimento de turnover dos fosfolípidios de membrana por meio da hidrólise da ligação 2- acil-éster de 3-sn-fosfolípidios – liberando assim os ácidos graxos livres, como o ácido araquidônico, que modulam funções celulares importantes associados a proliferação celular e angiogênese. Em tumores, as PLA2 induzem atividades antitumorais independente de atividades catalíticas e muito associadas a citotoxicidade e indução de apoptose provocada por estas enzimas, além de sua interação com o endotélio vascular - gerando uma inibição de angiogênese (Costa et al., 2008).

Tabela 1: Toxinas de *B. alternatus* com potencial antiparasitário e/ou antitumoral identificadas através da revisão bibliográfica de artigos publicados entre 2003 a 2023

Toxinas	Características bioquímicas	Métodos de purificação	Potencial terapêutico	Referência
Alternagin ALT-C (domínio)	SVMP; P-III; 55 kDa; inibe adesão celular mediada por colágeno – integrinas $\alpha 2\beta 1$	Cromatografias de exclusão molecular (Superdex-200), de interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose) e de troca iônica (Mono Q)	Antitumoral: inibe a adesão celular mediada por colágeno em células de leucemia humana e em tecido fibrovascular murino (<i>in vivo</i>); inibição de angiogênese em modelo murino (<i>in vivo</i>)	Souza et al., 2000; Rabelo et al., 2019; Ramos et al., 2007; Selistre de Araujo et al, 2005; Santos et al., 2020
BaG	SVMP; P-III; 130 kDa; inibe a agregação plaquetária induzida por ADP	Cromatografias de afinidade (Gelatin-Sepharose) e de troca iônica (DEAE-Sepharose)	Antitumoral: inibe a adesão celular em células leucemicas humana mediada pela interação da fibronectina com a integrina $\alpha 5\beta 1$	Cominetti et al., 2003
Baltergin	SVMP; P-III-b; 55 kDa; inibe a sinalização de adesão e migração celular	Cromatografias de troca iônica (DEAE-Cellulose) e de exclusão molecular (Sephadex G-75)	Antitumoral: induz apoptose por up-regulation da via intrínseca, inibiu a adesão e migração em células de músculo esquelético murino (C2C12)	Bustillo et al., 2017
BaltDC	SVMP; P-III; 32 kDa; inibe a agregação plaquetária	Cromatografias de troca iônica (DEAE-Sephacel) e de exclusão molecular (Sephadex G-75)	Antitumoral: Potencial inibição de receptores (integrinas) de adesão celular	Matias et al., 2017

BaltPLA2	PLA2 ácida; 14,07 kDa; inibe a agregação plaquetária, tem ação miotóxicas e pró- inflamatória	Cromatografias de troca iônica (DEAE-Sephacel) e de interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose)	Antiparasitário: ação antiviral contra o vírus da dengue	Dias et al, 2018; 2023
Balt-LAAO-II	LAAO; 66 kDa; geração de peróxido de hidrogênio	Cromatografias de exclusão molecular (Sephadex G-75) e de fase reversa (RP-HPLC C18)	Antitumoral: ação em células de leucemia humana por indução de apoptose via estresse oxidativo	Heleno et al., 2020
BaltTX-I	PLA2; 14.5 kDa; cataliticamente inativa	Cromatografias de troca iônica (CM-Sepharose), de interação hidrofóbica (Phenyl-Sepharose) e de fase reversa	Antiparasitário: ação antimicrobiana por estimulação de fagocitose via receptores do sistema complemento e proteína quinase C	Setúbal et al., 2012
Balt-LA00-I	LAAO; ácida; 123 kDa, induz agregação plaquetária	Cromatografias de afinidade (Shepharose-IDA), de interação hidrofóbica (Phenyl Sepharose), de exclusão molecular (Sephadex G100) e de fase reversa (C-4 HPLC)	Antiparasitário: ação antimicrobiana contra cepas de <i>Escherichia coli</i> e <i>Staphylococcus aureus</i> Antitumoral: ação citotóxica em linhagem JURKAT, SK-BR-3 e B16F10 via apoptose gerada por produção de espécies reativas de oxigênio	Stabéli et al., 2004 Ribeiro et al., 2016
DisBa-01	Desintegrina recombinante 11,637 kDa	Isolado de uma biblioteca de cDNA feita com RNAs da glândula de veneno de <i>B. alternatus</i>	Antitumoral: ação em tecido fibrovascular murino por inibição de componentes associados a formação tecidual	Vieria et al., 2014

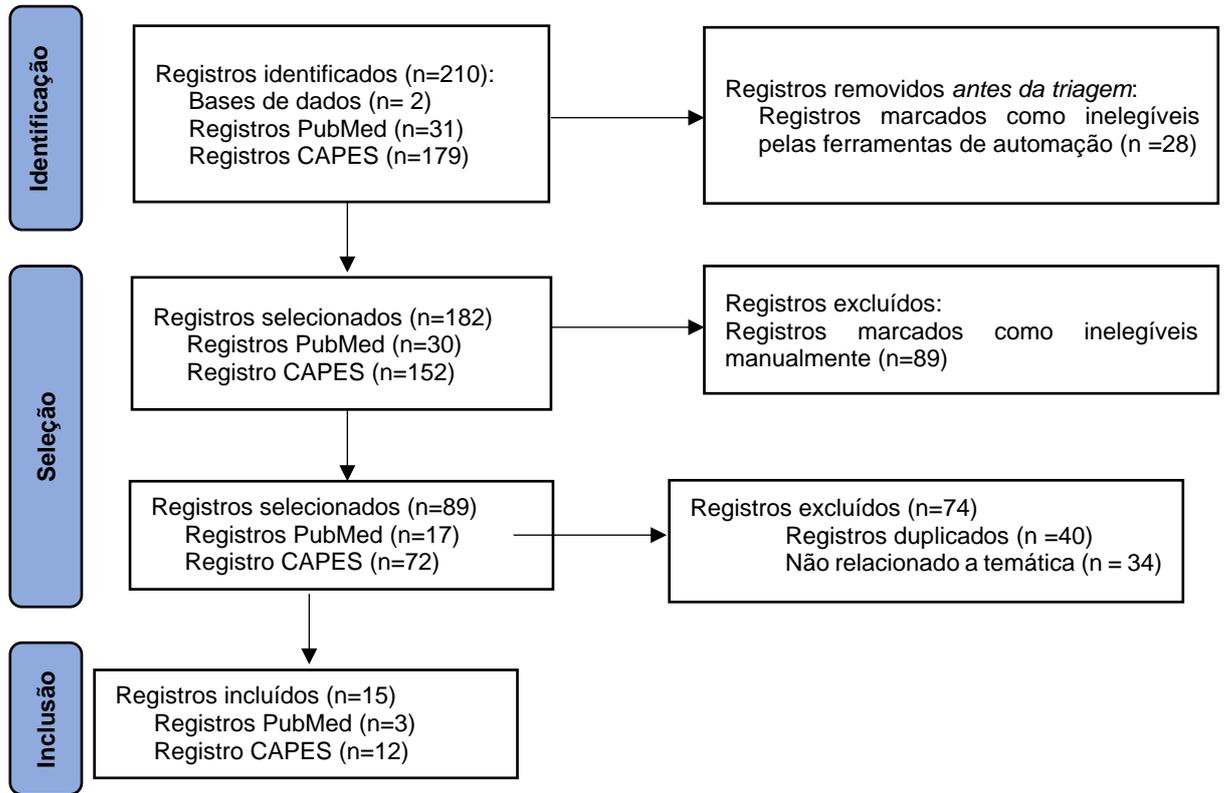


Figura 3: Fluxograma PRISMA de pesquisa em base de dados sobre as toxinas de *B. alternatus* entre 2003 e 2023. O fluxograma apresenta o fluxo da informação através das diferentes fases da revisão da literatura e o número de registros que foram identificados e incluídos. Adaptado de Page et al., 2021.

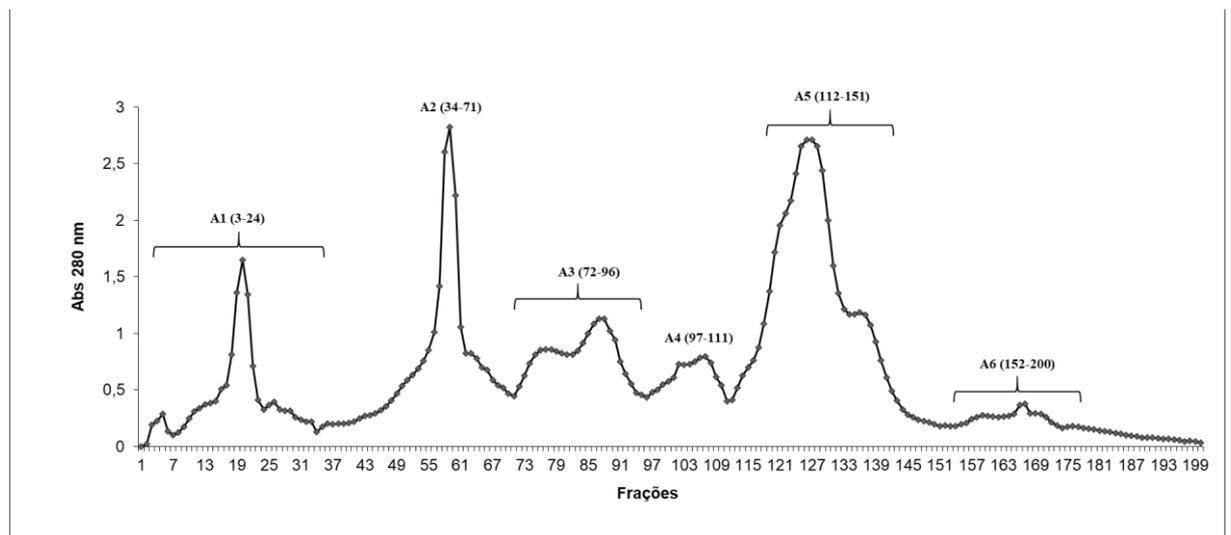


Figura 4: Fracionamento da peçonha de *B. alternatus*. A peçonha bruta de *B. alternatus* (573,6 mg) foi aplicada em cromatografia de troca iônica (DEAE-Sephacel), eluída em gradiente crescente de AMBIC (0,05 M

– 1 M), a um fluxo de 20mL/hora e foram coletadas frações de 3 mL. As frações foram analisadas quanto à absorbância (Abs) em UV (280 nm), reunidas em 6 picos principais, denominados como A1 a A6.

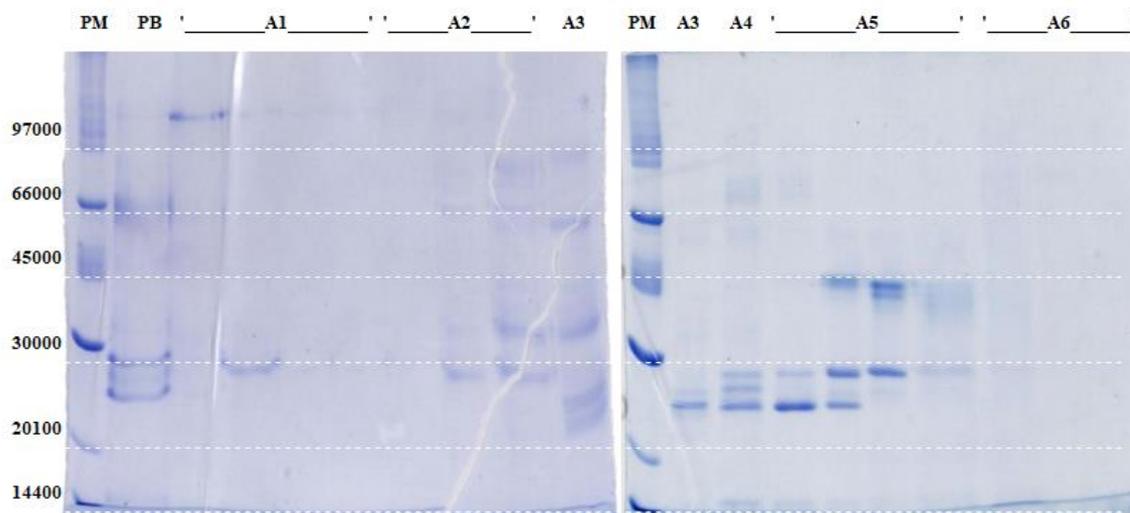


Figura 5: SDS-PAGE a 14% das frações obtidas a partir da peçonha bruta de *B. alternatus*. PM: padrão de massa molecular contendo, fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa); PB: peçonha bruta de *B. alternatus* (50 μ g/25 μ L); A1-A6: frações proteicas (50 μ g/25 μ L).

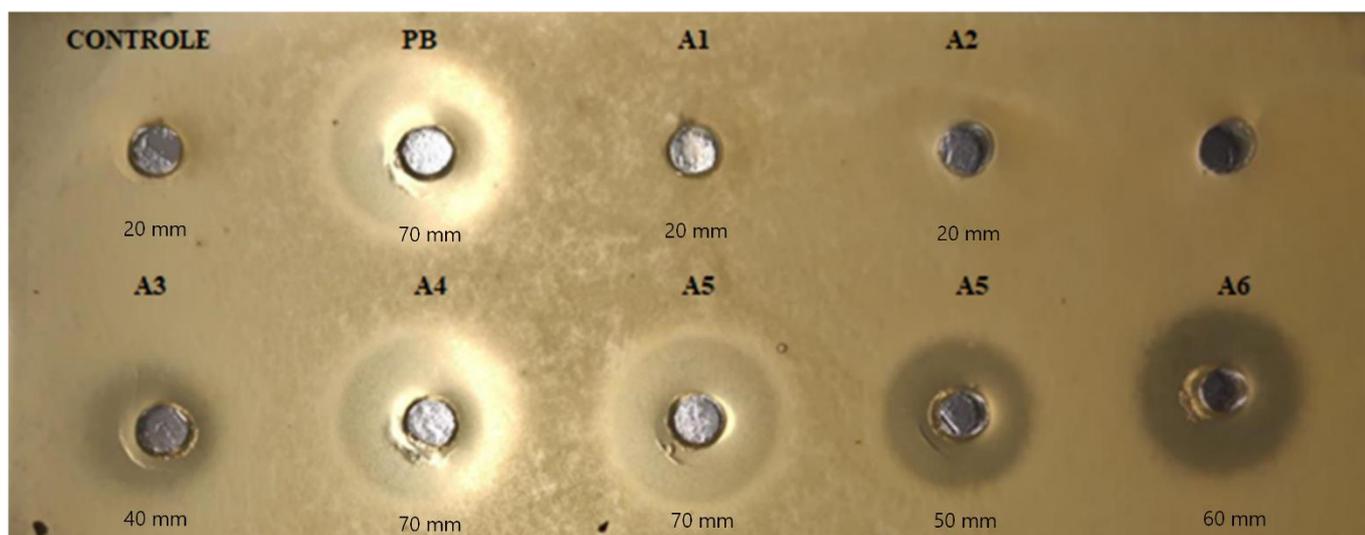


Figura 6: Atividade fosfolipásica das frações de *B. alternatus* (50 μ g/25 μ L). Atividade fosfolipásica em gel de ágar emulsificado com gema de ovo de galinha, de amostras resultantes do fracionamento da peçonha bruta de *B. alternatus* em cromatografia DEAE-Sephacel, após 48 horas de incubação à temperatura ambiente. A ação fosfolipásica foi confirmada pela formação de halos translúcidos ao redor do local de aplicação das amostras. Controle: água destilada; PB: peçonha bruta de *B. alternatus*; A1-A6: frações proteicas.

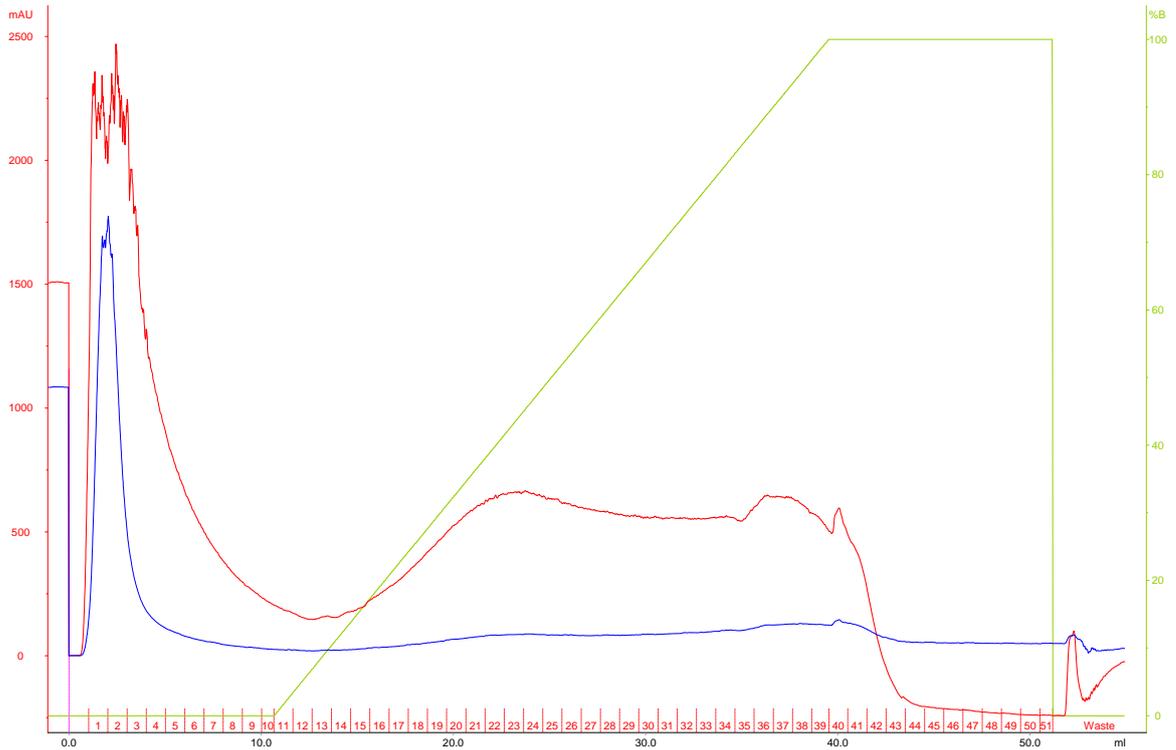


Figura 7: Purificação da fração A4 de *B. alternatus*. A: Cerca de 28 mg da fração A4 de *B. alternatus* foram aplicados em resina Butyl-Sepharose em FPLC (HiTrap Butyl-S FF - 1 mL), eluída em gradiente decrescente de NaCl (4 M – 0 M) diluído em Tris HCl (0,01 M, pH 8,5), a um fluxo de 20mL/hora e foram coletadas frações de 3 mL. A: As frações foram analisadas quanto à absorvância (Abs) em UV (280 nm), reunidas em 3 picos principais, denominados como A4a, A4b e A4c.

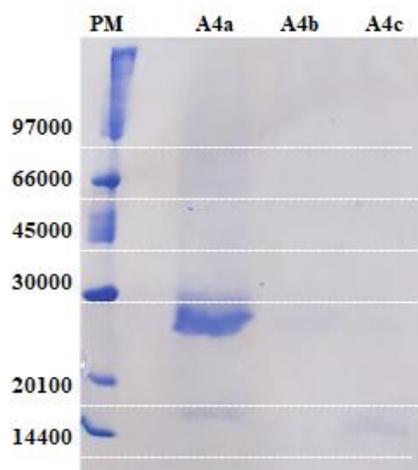


Figura 8: SDS-PAGE a 14%, sob condições não redutoras, do perfil proteico de amostras (50µg/25µL) resultantes do fracionamento da fração A4 de *B. alternatus*. Legenda: Cromatograma: linha vermelha (mUA) – valores de unidades de absorvância em 214 nm; linha azul (mUA) – valores de unidades de absorvância em 280 nm; linha verde (%B) – porcentagem de eluição com o solvente B; PM: padrão de massa molecular contendo,

fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa); A4a-A4c: subfrações proteicas.

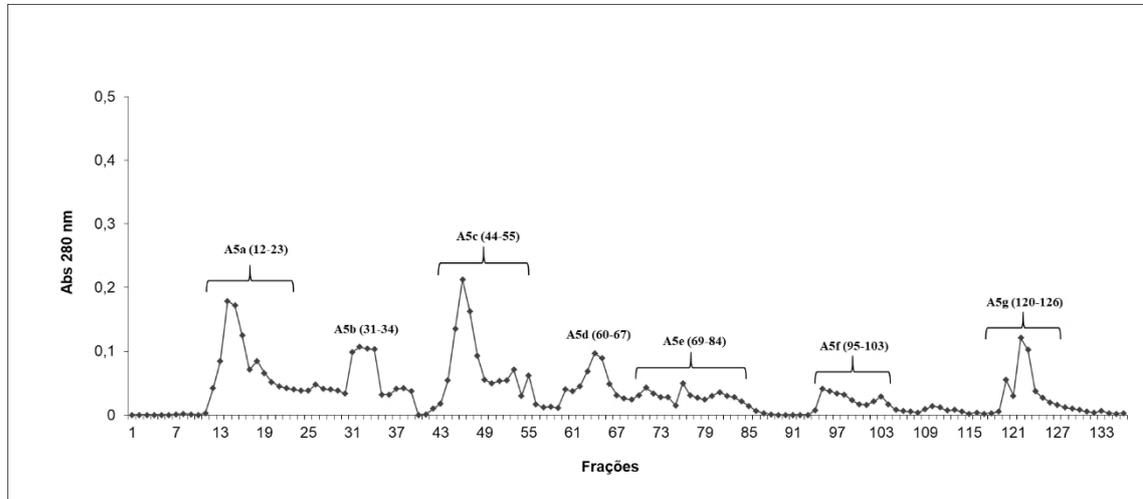


Figura 9: Purificação da fração A5 de *B. alternatus*. A: Cerca de 20 mg da fração A5 de *B. alternatus* foram aplicados em resina Phenyl-Sepharose, eluída em gradiente decrescente de NaCl (4 M – 0 M) diluído em Tris HCl (0,01 M, pH 8,5), a um fluxo de 20mL/hora e foram coletadas frações de 3 mL. A: As frações foram analisadas quanto à absorbância (Abs) em UV (280 nm), reunidas em 7 picos principais, denominados de A5a a A5g.

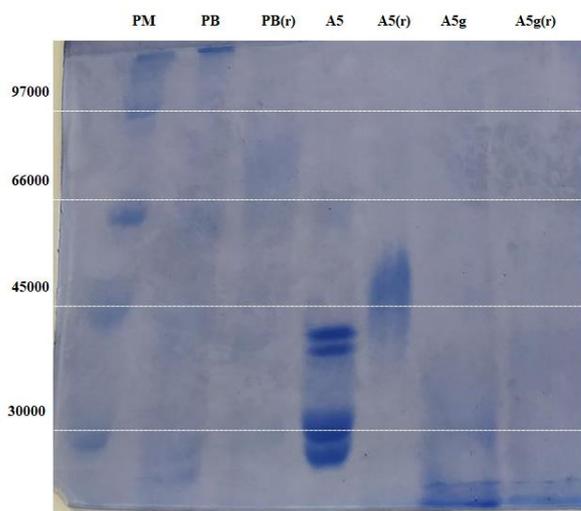


Figura 10: SDS-PAGE a 14%, sob condições redutoras e não redutoras, do perfil proteico de amostras (50 μ g/25 μ L) resultantes do fracionamento da amostra A5 de *B. alternatus*. Legenda: PM: padrão de massa molecular apresentando, fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa) e anidrase carbônica (30 kDa); PB, A5 e A5g: peçonha bruta de *B. alternatus*, fração A5 e subfração A5g, em condições não redutoras; PB(r), A5(r) e A5g(r): peçonha bruta de *B. alternatus*, fração A5 e subfração A5g, em condições redutoras (presença de DTT), respectivamente. As demais subfrações de A5 não apresentaram marcações durante a análise.

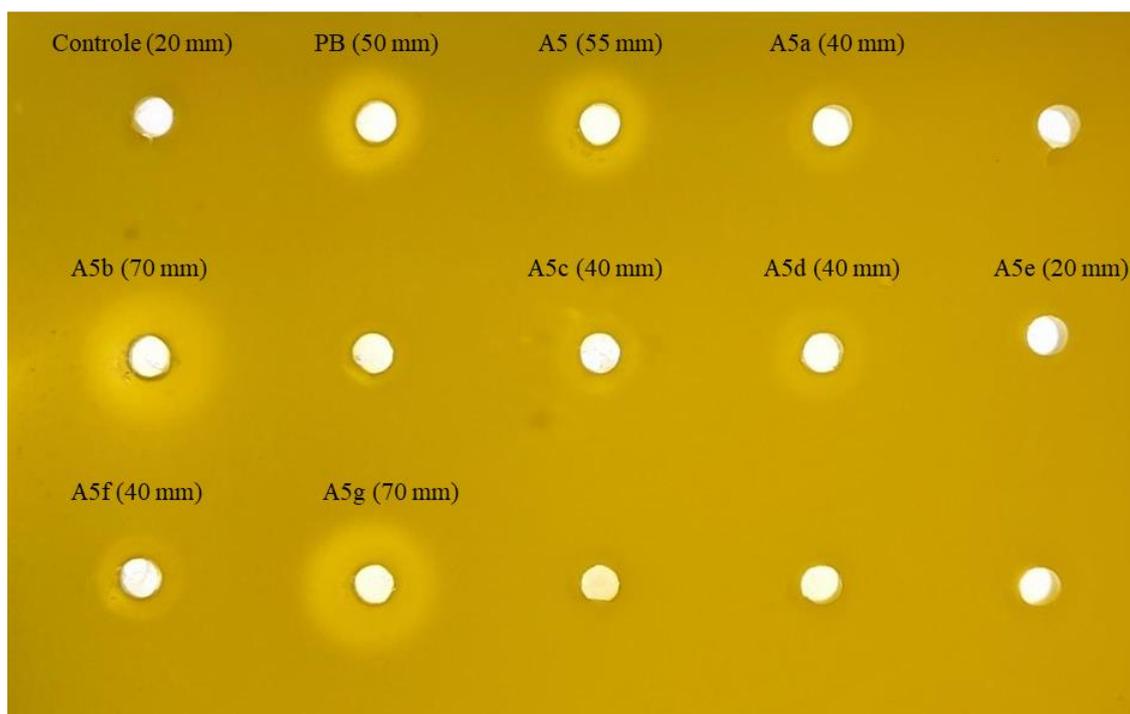


Figura 11: Atividade fosfolipásica da fração A5 de *B. alternatus* e subfrações (50µg/25µL). A atividade fosfolipásica, em gel de ágar emulsificado com gema de ovo de galinha, de amostras resultantes da purificação da fração A5 de *B. alternatus* em cromatografia Phenyl-Sepharose, após 48 horas de incubação à temperatura ambiente. Os valores expressos em milímetros (mm) indicam o diâmetro do halo formado no gel, considerando a medida do orifício onde a amostra foi aplicada. Legenda: Controle: água destilada; PB: peçonha bruta de *B. alternatus*; A5: fração A5 de *B. alternatus*; A5a – A5g: subfrações de A5.

Tabela 2: Rendimento proteico das frações e subfrações da peçonha de *B. alternatus*

Peçonha bruta	A4	A4c	A5	A5g
573,6 mg	28 mg	0,8 mg	20 mg	1,6 mg
100%	4,9%	0,1 %	3,5%	0,3%

A porcentagem indica a massa da fração ou subfração proteica em relação à massa total de peçonha bruta que foi aplicada no primeiro passo cromatográfico.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

As serpentes do gênero *Bothrops* são comumente encontradas no território brasileiro e sua peçonha apresenta uma vasta gama de compostos com ações variadas com potencial biomédico a ser explorado.

A partir dos resultados obtidos pela análise dos dados da pesquisa bibliográfica realizada que inúmeros componentes derivados da peçonha podem ser empregados para prospecção de novas abordagens terapêuticas nos mais diversos âmbitos. Foram identificadas 9 proteínas com potencial antitumoral, antiparasitário e ou antimicrobiano, em especial, a fosfolipase BaltPLA2.

Os métodos de purificação desenvolvidos neste trabalho permitiram a obtenção de frações relevantes com atividade enzimática, com a purificação parcial de duas frações – A4 e A5 – e subfrações – A4c e A5g – com características similares a fosfolipases

Os procedimentos executados, no entanto, demonstraram um baixo rendimento proteico ao final do processo de purificação – que pode ser resultado de fatores como tempo de armazenamento das amostras, instabilidade de equipamentos utilizados entre outros.

Esses resultados indicam que metodologias mais refinadas devem ser empregadas no intuito de obter uma purificação com rendimento e grau de pureza mais elevado, indicando que novos estudos são necessários.

6 REFERÊNCIAS

ARLINGHAUS, Franziska T.; EBLE, Johannes A. C-type lectin-like Proteins from Snake Venoms. **Toxicon**, [S. l.], v. 60, n. 4, p. 512–519, 2012. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.03.001>.

AZEVEDO, Fernanda V. P. V. et al. Human breast cancer cell death induced by BnSP-6, a Lys-49 PLA2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 82, p. 671–677, 2016. DOI: [10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080](https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.10.080).

BHAT, Shreesha K. et al. Serine proteinases from *Bothrops* snake venom activates PI3K/Akt mediated angiogenesis. **Toxicon**, [S. l.], v. 124, p. 63–72, 2016. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.11.001>.

BORGES, Isabela P. et al. Anti-parasitic effect on *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**, [S. l.], v. 119, p. 84–91, 2016. DOI: [10.1016/j.toxicon.2016.05.010](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.010).

BRASIL. Ministério da Saúde. Boletim Epidemiológico: Acidentes ofídicos no Brasil em 2021 vol. 53 N° 36. Brasil; **Ministério da Saúde**, 2022. 14-19 p. Disponível em:

<https://www.gov.br/saude/pt-br/centrais-de-conteudo/publicacoes/boletins/epidemiologicos/edicoes/2022/boletim-epidemiologico-vol-53-no36/view>.

BURIN, Sandra M. et al. *Bothrops moojeni* L-amino acid oxidase induces apoptosis and epigenetic modulation on Bcr-Abl+ cells. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, [S. l.], v. 26, 2020. DOI: 10.1590/1678-9199-jvatitd-2020-0123.

BUSTILLO, Soledad et al. Apoptosis Induced by a Snake Venom Metalloproteinase from *Bothrops alternatus* Venom in C2C12 Muscle Cells. **Apoptosis**, [S. l.], v. 22, n. 4, p. 491–501, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1007/s10495-017-1350-x>.

CALIXTO, João B. The role of natural products in modern drug discovery. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, [S. l.], v. 91, n. suppl 3, 2019. DOI: 10.1590/0001-3765201920190105.

CAMPOS, Letícia D. et al. In vitro comparison of enzymatic effects among *Brazilian Bothrops spp.* venoms. **Toxicon**, [S. l.], v. 76, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2013.08.063>.

CASSINI-VIEIRA, Puebla; et al. DisBa-01 Inhibits angiogenesis, Inflammation and Fibrogenesis of sponge-induced-fibrovascular Tissue in Mice. **Toxicon**, [S. l.], v. 92, p. 81–89, 2014. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.007>.

CASWELL, Nicholas R et al. Causes and Consequences of Snake Venom Variation. **Trends in Pharmacological Sciences**, [S. l.], v. 41, n. 8, p. 570–581, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>.

CHAN, Yau Sang et al. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, [S. l.], v. 100, n. 14, p. 6165–6181, 2016. DOI: 10.1007/s00253-016-7610-9.

COSTA, Tassia R. et al. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, [S. l.], v. 29, n. 10, p. 1645–1656, 2008. DOI: 10.1016/j.peptides.2008.05.021.

COMINETTI, Márcia R et al. BaG, a new dimeric metalloproteinase/disintegrin from the *Bothrops alternatus* snake venom that interacts with $\alpha 5\beta 1$ integrin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 416, n. 2, p. 171–179, 2003. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0003-9861\(03\)00298-4](https://doi.org/10.1016/s0003-9861(03)00298-4).

DIAS, Edigar H. V. et al. BaltPLA2: A New Phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* Snake Venom with Antiplatelet Aggregation Activity. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 25, n. 10, p. 943–952, 2018. DOI: [10.2174/0929866525666](https://doi.org/10.2174/0929866525666)

DIAS, Edigar H. V. et al. Effect of BaltPLA2, a phospholipase A2 from *Bothrops alternatus* snake venom, on the viability of cells infected with dengue virus. **Toxicology in Vitro**, [S. l.], v. 88, p. 105562–105562, 2023. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2023.105562>.

DU, Xiao-Yan; CLEMETSON, Kenneth J. Snake venom l-amino acid oxidases. **Toxicon**, [S. l.], v. 40, n. 6, p. 659–665, 2002. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/s0041-0101(02)00102-2).

EL-AZIZ, Mohamed A.; GARCIA, S. S. Snake Venoms in Drug Discovery: Valuable Therapeutic Tools for Life Saving. **Toxins**, [S. l.], v. 11, n. 10, p. 564, 2019. DOI: [10.3390/toxins11100564](https://doi.org/10.3390/toxins11100564).

ESTEVIÃO-COSTA, Maria-Inacia et al. Snake venom components in medicine: From the symbolic rod of Asclepius to tangible medical research and application. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, [S. l.], v. 104, p. 94–113, 2018. DOI: [10.1016/j.biocel.2018.09.011](https://doi.org/10.1016/j.biocel.2018.09.011).

FERRAZ, Camila R et al. Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. **Frontiers in Ecology and Evolution**, [S. l.], v. 7, 2019. DOI: [10.3389/fevo.2019.00218](https://doi.org/10.3389/fevo.2019.00218).

GUTIÉRREZ, José María; LOMONTE, Bruno. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, [S. l.], v. 62, p. 27–39, 2013. DOI: [10.1016/j.toxicon.2012.09.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.006).

GUTIÉRREZ, José María et al. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, [S. l.], v. 3, n. 1, 2017. DOI: <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>.

GUTIÉRREZ, José María et al. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins**, [S. l.], v. 8, n. 4, p. 93, 2016. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins8040093>.

KANG, Tse Siang et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, [S. l.], v. 278, n. 23, p. 4544–4576, 2011. DOI: [10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x](https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x).

KUENZI, Brent M.; IDEKER, Trey. A census of pathway maps in cancer systems biology. **Nature Reviews Cancer**, [S. l.], v. 20, n. 4, p. 233–246, 2020. DOI: [10.1038/s41568-020-0240-7](https://doi.org/10.1038/s41568-020-0240-7).

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, [S. l.], v. 227, n. 5259, p. 680–685, 1970. DOI: [10.1038/227680a0](https://doi.org/10.1038/227680a0).

LAYNE, Ennis. Spectrophotometric and Turbidimetric Methods for Measuring Proteins. **Methods in Enzymology**, [S. l.], v. 6, n. 14, p. 447–454, 1957. DOI: [https://doi.org/10.1016/s0076-6879\(57\)03413-8](https://doi.org/10.1016/s0076-6879(57)03413-8).

MAMEDE, Carla C. N. et al. Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, [S. l.], v. 117, p. 37–45, 2016. DOI: [10.1016/j.toxicon.2016.03.006](https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.006).

MAMEDE, Carla C. N. et al. Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. **Toxicon**, [S. l.], v. 187, p. 10–18, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2020.08.016>.

MARKLAND, Francis S.; SWENSON, Stephen. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, [S. l.], v. 62, p. 3–18, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>.

MILLS, Roger M. Chagas Disease: Epidemiology and Barriers to Treatment. **The American Journal of medicine**, [S. l.], v. 133, n. 11, p. 1262–1265, 2020. DOI: [10.1016/j.amjmed.2020.05.022](https://doi.org/10.1016/j.amjmed.2020.05.022).

MUNAWAR, Aisha et al. Snake Venom Peptides: Tools of Biodiscovery. **Toxins**, [S. l.], v. 10, n. 11, p. 474, 2018. DOI: <https://doi.org/10.3390/toxins10110474>.

ÖHLER, Michaela et al. The Venomics of *Bothrops alternatus* is a Pool of Acidic Proteins with Predominant Hemorrhagic and Coagulopathic Activities. **Journal of Proteome Research**, [S. l.], v. 9, n. 5, p. 2422–2437, 2010. DOI: <https://doi.org/10.1021/pr901128x>.

OLIVEIRA, Ana L. et al. The chemistry of snake venom and its medicinal potential. **Nature Reviews Chemistry**, [S. l.], v. 6, n. 7, p. 451–469, 2022. DOI: [10.1038/s41570-022-00393-7](https://doi.org/10.1038/s41570-022-00393-7).

PAES LEME, A. F et al. *Bothrops* protease A, a unique highly glycosylated serine proteinase, is a potent, specific fibrinogenolytic agent. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, [S. l.], v. 6, n. 8, p. 1363–72, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1111/j.1538-7836.2008.02995.x>.

PAGE, Matthew J. et al. The PRISMA 2020 statement: an Updated Guideline for Reporting Systematic Reviews. **British Medical Journal**, [S. l.], v. 372, n. 71, 2021. DOI: <https://doi.org/10.1136/bmj.n71>.

QUEIROZ, Giselle P. et al. Interspecific Variation in Venom Composition and Toxicity of Brazilian Snakes from *Bothrops* Genus. **Toxicon**, [S. l.], v. 52, n. 8, p. 842–851, 2008. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.002>.

RABELO, Luis F. G et al. Alternagin-C, a disintegrin-like Protein from *Bothrops alternatus* venom, Attenuates Inflammation and Angiogenesis and Stimulates Collagen Deposition of sponge-induced Fibrovascular Tissue in Mice. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 140, p. 653–660, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.08.171>.

RAO, Wei-qiao et al. The rise of genomics in snake venom research: recent advances and future perspectives. **GigaScience**, [S. l.], v. 11, 2022. DOI: [10.1093/gigascience/giac024](https://doi.org/10.1093/gigascience/giac024).

RAMOS, Oscar H. P et al. Modulation of in vitro and in vivo angiogenesis by alternagin-C, a disintegrin-like protein from *Bothrops alternatus* snake venom and by a peptide derived from its sequence. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 461, n. 1, p. 1–6, 2007. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.abb.2007.02.021>.

ROCHA, Marisa M. T. Da; FURTADO, Maria de F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus* Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica

no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, [S. l.], v. 22, n. 2, p. 383–393, 2005. DOI: 10.1590/S0101-81752005000200012.

RODRIGUES, Renata et al. Snake Venom Phospholipases A2: A New Class of Antitumor Agents. **Protein & Peptide Letters**, [S. l.], v. 16, n. 8, p. 894–898, 2009. DOI: 10.2174/092986609788923266.

SANTOS, Patty K. Dos et al., a disintegrin-like protein, attenuates alpha2beta1 integrin and VEGF receptor 2 signaling resulting in angiogenesis inhibition. **Biochimie**, [S. l.], v. 174, p. 144–158, 2020. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2020.04.023>.

SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S et al. Alternagin-C, a disintegrin-like protein from the venom of *Bothrops alternatus*, modulates alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion, migration and proliferation. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, [S. l.], v. 38, p. 1505–1511, 2005. DOI: <https://doi.org/10.1590/S0100-879X2005001000007>.

SETÚBAL, S. S. et al. Action of two phospholipases A2 purified from *Bothrops alternatus* snake venom on macrophages. Biochemistry. **Biokhimiia**, [S. l.], v. 78, n. 2, p. 194–203, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1134/S0006297913020089>.

SILVA, Maxwell A. et al. Genotoxic effects of BnSP-6, a Lys-49 phospholipase A2 (PLA2) homologue from *Bothrops pauloensis* snake venom, on MDA-MB-231 breast cancer cells. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 118, p. 311–319, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2018.06.082.

SOARES, Andreimar M. et al. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, [S. l.], v. 36, n. 3, p. 503–514, 1998. DOI: 10.1016/S0041-0101(97)00133-5.

SOBRINHO, Juliana C. et al. Anti-platelet aggregation activity of two novel acidic Asp49-phospholipases A2 from *Bothrops brazili* snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, [S. l.], v. 107, p. 1014–1022, 2018. DOI: 10.1016/j.ijbiomac.2017.09.069.

SURANSE, Vivek; JACKSON, Timothy N. W.; SUNAGAR, Kartik. Contextual Constraints: Dynamic Evolution of Snake Venom Phospholipase A2. **Toxins**, [S. l.], v. 14, n. 6, p. 420, 2022. DOI: 10.3390/toxins14060420.

SOUSA, Leijiane F. et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, [S. l.], v. 7, n. 9, p. e2442, 2013. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002442>.

SOUZA, D. H. F et al. The Disintegrin-like Domain of the Snake Venom Metalloprotease Alternagin Inhibits $\alpha 2\beta 1$ Integrin-Mediated Cell Adhesion. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, [S. l.], v. 384, n. 2, p. 341–350, 2000. DOI: <https://doi.org/10.1006/abbi.2000.2120>.

TASOULIS, Theo; ISBISTER, Geoffrey. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, [S. l.], v. 9, n. 9, p. 290, 2017. DOI: 10.3390/toxins9090290.

TASOULIS, Theo; PUKALA, Tara L.; ISBISTER, Geoffrey K. Investigating Toxin Diversity and Abundance in Snake Venom Proteomes. **Frontiers in Pharmacology**, [S. l.], v. 12, 2022. DOI: 10.3389/fphar.2021.768015.

VONK, Freek J. et al. Snake venom: From fieldwork to the clinic. **BioEssays**, [S. l.], v. 33, n. 4, p. 269–279, 2011. DOI: <https://doi.org/10.1002/bies.201000117>.

WAHEED, Humera; MOIN, Syed F.; CHOUDHARY, M. I. Snake Venom: From Deadly Toxins to Life-saving Therapeutics. *Current Medicinal Chemistry*. **Chemistry**, [S. l.], v. 24, n. 17, 2017. DOI: 10.2174/0929867324666170605091546.