

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com fosfolipases (PLA₂s) de diferentes peçonhas ofídicas e predição *in silico* de epítomos de células B

Sâmela Nascimento Alves

Monografia apresentada à Coordenação do Curso de Biotecnologia, da Universidade Federal de Uberlândia, para obtenção do grau de Bacharel em Biotecnologia.

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com fosfolipases (PLA₂s) de diferentes peçonhas ofídicas e predição *in silico* de epítomos de células B

Sâmela Nascimento Alves

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

Co-orientador (a): Msc. Isabela Pacheco Borges

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

Uberlândia - MG

Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com fosfolipases
(PLA₂s) de diferentes peçonhas ofídicas e predição *in silico* de epítomos de células B

Sâmela Nascimento Alves

Orientador (a): Profa. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila
Instituto de Biotecnologia

Co-orientador (a): Msc. Isabela Pacheco Borges
Instituto de Biotecnologia

Homologado pela coordenação do Curso
de Biotecnologia em __/__/__

Coordenador (a) do Curso: Edgar Silveira Campos

Uberlândia - MG
Fevereiro – 2019

UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA
CURSO BIOTECNOLOGIA

Reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com fosfolipases
(PLA₂s) de diferentes peçonhas ofídicas e predição *in silico* de epítomos de células B

Sâmela Nascimento Alves

Aprovado pela Banca Examinadora em: / / Nota: _____

Presidente da Banca Examinadora: Prof^ª. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Ass: _____

Uberlândia, de de

*Eu dedico esse projeto a minha família
que sempre esteve ao meu lado me
incentivando e apoiando em todo o
tempo. Em especial, dedico a minha
mãe, mulher forte e guerreira que
batalhou para que eu estudasse e tivesse
um futuro.*

Agradecimentos

Agradeço primeiro a Deus, porque todos os dias Ele me deu o conhecimento e sabedoria necessária para que pudesse estudar, capacitando a minha mente para que eu aprendesse e crescesse durante esses anos de faculdade.

Agradeço também a minha família, pois sempre me deram suporte nos momentos mais difíceis e não permitiram que eu desistisse.

Agradeço também aos meus amigos de faculdade, amizades que me socorreram em muitas ocasiões e que marcaram a minha vida.

E por fim agradeço ao pessoal do LabiTox, que me deram suporte para que hoje pudesse fazer esse trabalho, em especial a minha orientadora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila e a minha co-orientadora Msc. Isabela Pacheco Borges.

RESUMO

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* é composta principalmente por enzimas dentre estas as fosfolipases A₂ (PLA₂). As PLA₂s dessas peçonhas podem ser classificadas em cataliticamente ativas (PLA₂s Asp-49) e inativas (PLA₂s Lys-49). Esta última classe representa uma das principais moléculas responsáveis pelos efeitos locais após o envenenamento que podem ser caracterizados por bloqueio neuromuscular, inflamação, danos ao sarcolema, edema, mionecrose, entre outros. O objetivo desse estudo foi verificar a reatividade cruzada por ensaio de ELISA de anticorpos IgY anti-BnSP-7 produzidos em galinhas contra diferentes peçonhas botrópicas (*B. pauloensis*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. marajoensis*, *B. diporus*, *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. brazili*) e PLA₂s isoladas das peçonhas de *B. pauloensis* (BnSP-6 e BnSP-7), *B. jararacussu* (BThTX-I e BThTX-II) e *B. moojeni* (MjTX-II), bem como realizar a predição *in silico* através de ferramentas de bioinformática para a análise de epítomos de células B conservadas na estrutura de PLA₂s e que estejam relacionados à função biológica dessa classe de proteínas. Os resultados encontrados demonstraram que as peçonhas de *B. pauloensis*, *B. moojeni* e *B. jararacussu* e as toxinas BnSP-6, BThTX-I e BThTX-II apresentaram alta reatividade cruzada com altos valores de índice ELISA. A predição *in silico* de epítomos de células B revelaram importantes domínios conservados na PLA₂ BnSP-7 que podem ser responsáveis por suas atividades. Finalmente, as análises de sobreposições 3D demonstraram que as PLA₂s da peçonha de *B. jararacussu* apresentaram alto grau de homologia estrutural com a BnSP-7. Analisados em conjunto, os resultados demonstraram que a alta reatividade cruzada dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 contra diferentes peçonhas botrópicas e PLA₂s isoladas, juntamente com a identificação de epítomos de regiões conservadas nas PLA₂s podem auxiliar novos estudos que visam a utilização destes anticorpos para a neutralização de efeitos biológicos induzidos por essas proteínas. Além disso, permite o mapeamento de domínios estruturais importantes para a função de PLA₂s presentes em diferentes organismos.

Palavras chaves: Anticorpos; Células B; Bioinformática; Fosfolipases A₂

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1. Acidentes ofídicos	2
1.2. Classificação e características estruturais e funcionais das PLA ₂ s.....	4
1.3. Soroterapia em acidentes ofídicos	10
2.0 OBJETIVOS.....	13
2.1. Objetivo geral	14
2.2. Objetivos específicos	14
3.0 MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1. Obtenção das peçonhas.....	17
3.2. Obtenção do anticorpo IgY anti-BnSP-7	17
3.3. Dosagem das proteínas	17
3.4. Eletroforese em géis de poliacrilamida(SDS-PAGE).....	18
3.5. Ensaio de reatividade cruzada por ELISA.....	18
3.6. Seleção de epítomos de células B e sobreposição de estruturas 3D	19
3.7. Análise estatística	19
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	21
4.1. Análise do perfil eletroforético das peçonhas botrópicas e crotálicas por SDS PAGE em condições redutoras	22
4.2. Análise da reatividade cruzada (ELISA)	24
4.3. Mapeamento de epítomos de célula B	28
4.4. Sobreposição de estruturas 3D	31
5.0 CONCLUSÃO	34
6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	36

LISTA DE TABELAS

1. PLA₂s Asp-49 e Lys-49 isoladas de espécies do gênero *Bothrops*.....9
2. Massas moleculares de PLA₂s presentes nas espécies dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.....23
3. Porcentagem da identidade e similaridade entre a BnSP-7 e PLA₂s Asp-49 básicas e ácidas.....27

LISTA DE FIGURAS

1.	Porcentagem de acidentes notificados de acordo com o gênero: <i>Bothrops</i> , <i>Crotalus</i> , <i>Lachesis</i> e <i>Micrurus</i>	3
2.	Cinco tipos de PLA ₂ s e seus respectivos sítios de clivagem.....	4
3.	Representação do sítio catalítico de uma PLA ₂ com o aminoácido Asp na posição 49 (à esquerda) e com Lys na posição 49 (à direita).....	5
4.	Representação esquemática do enovelamento de um monômero de PLA ₂	6
5.	Representação dos dois tipos de dímeros de PLA ₂	7
6.	Regiões C-terminais conservadas nas PLA ₂ s Lys49 ACL (<i>Agkistrodon contortrix laticinctus</i>), AppK (<i>Agkistrodon piscivorus piscivorus</i>), BThTX-I (<i>Bothrops jararacussu</i>), e MT-II (<i>Bothrops asper</i>).....	8
7.	Diferença entre as porções Fc dos anticorpos IgG e IgY.....	12
8.	Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE de peçonhas botrópicas e crotálicas em condições redutoras na presença de β-mercaptoetanol. Tempo de corrida 100 min. a 12mA.....	23
9.	Reatividade cruzada do anticorpo Anti-BnSP-7 (2μg/mL) por ensaio de ELISA contra diferentes peçonhas botrópicas.....	25
10.	Reatividade cruzada do anticorpo Anti-BnSP-7 (2μg/mL) por ensaio de ELISA contra as PLA ₂ s (10μg/mL) isoladas BnSP-7, BnSP-6, BThTX-I e BThTX-II e MjTX-II de <i>B. pauloensis</i> , <i>B. jararacussu</i> e <i>B. moojeni</i>	26
11.	Alinhamento múltiplo ClustalW das PLA ₂ s Lys49 BnSP-7, BnSP-6, BThTX-I e MjTX-II.....	27

12.	Sequência de resíduos de aminoácidos da PLA ₂ Lys49 BnSP-7.....	28
13.	Marcação dos epítomos. (A) Representação da estrutura tridimensional da BnSP-7 para a localização dos epítomos na estrutura terciária e (B) Representação da superfície da proteína (C) Regiões MDiS e MDoS com os seus respectivos aminoácidos, locais de possíveis reconhecimento para neutralização da atividade citotóxica.....	30
14.	Sobreposição entre a estrutura 3D da BnSP-7 (PDB: 1PA0) e a principal PLA ₂ s da peçonha de <i>B. jararacussu</i> , BThTX-I (PDB: 3HZD) representadas nas cores vermelha e amarela, respectivamente.....	32
15.	Sobreposição entre a estrutura 3D da BnSP-7 (PDB: 1PA0) e a segunda principal PLA ₂ s da peçonha de <i>B. jararacussu</i> , BThTX-II (PDB: 2OQD) representadas nas cores vermelha e laranja, respectivamente.....	32

LISTA DE ABREVIATURAS

PLA₂ - Fosfolipase A₂

MDoS - *Membrane-DockingSite*

MDiS - *Membrane-Disruption Site*

Lys - Lisina

Asp - Aspartato

Tyr - Tirosina

Leu - Leucina

Gly - Glicina

Asn -Asparagina

Val - Valina

Arg - Arginina

Phe -Fenilalanina

ACL - *Agkistrodon contortrix laticinctus*

AppK- *Agkistrodon piscivorus piscivorus*

Mt-II - Miotoxina II (*Bothrops asper*)

BThTX-I - Botropstoxina I (PLA₂ de *Bothrops jararacussu*)

BThTX-II - Botropstoxina II (PLA₂ de *Bothrops jararacussu*)

MjTX-I - Miotoxina I (PLA₂ de *Bothrops moojeni*)

MjTX-II - Miotoxina II (PLA₂ de *Bothrops moojeni*)

MyoII - Miotoxina II (PLA₂ de *Bothrops asper*)

MT-I - Miotoxina I (PLA₂ de *Bothrops asper*)

PrTX-I -Piratoxina I (*Bothrops pirajai*)

BCR - Receptor de célula B

IgG - imunoglobulina G

IgY - imunoglobulina Y

NCBI - *National Center for Biotechnology Information*

UniProt - *Universal Protein*

IgM - imunoglobulina M

ELISA - *Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay*

BSA - soroalbumina bovina

IEDB - *Immune Epitope Database and Analysis Resource*

IE - Índice ELISA

BnSP-7 - Fosfolipase A₂ Lys 49 básica (*Bothrops pauloensis*)

BnSP-6 - Fosfolipase A₂ Lys 49 básica (*Bothrops pauloensis*)

RMSD - *Root Mean Square Deviation*

TMscore - *Template Modelling score*

1.0 INTRODUÇÃO

1.1. Acidentes ofídicos

Os animais peçonhentos estão amplamente distribuídos no planeta, estando presentes nos mais variados grupos como répteis, peixes, moluscos, aracnídeos, entre outros (Ministério da Saúde, 2018). Dentre os animais peçonhentos destacam-se as serpentes com cerca de 2.900 espécies distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No território brasileiro há 321 espécies, 75 gêneros e 9 famílias descritas (Fundação Ezequiel Dias, 2014).

A presença da peçonha nesses animais causa grande transtorno aos indivíduos acometidos pela inoculação dessas em seu organismo, constituindo assim, um problema de saúde pública (Ministério da Saúde, 2018). No mundo, estima-se a ocorrência de 1,8 a 2,7 milhões de acidentes ofídicos anualmente ocasionando cerca de 81 mil a 138 mil óbitos. Por isso, em 2017 os acidentes ofídicos voltaram a ser reconhecidos pela OMS como doença tropical negligenciada (Ministério da Saúde, 2018).

No Brasil foram notificados 28.636 acidentes ofídicos no ano de 2017, evoluindo para óbito 106 casos, sendo as populações de baixa renda mais afetadas e propícias à morte, pois habitam em locais de difícil acesso (maioria das vítimas é formada por trabalhadores rurais), havendo muitas vezes em casos de sobrevivência sequelas como restrição de mobilidade, amputações, cegueira e stress pós-traumático (Ministério da Saúde, 2018).

Os acidentes ofídicos por serpentes peçonhentas de interesse em saúde pública pertencem às Famílias Viperidae e Elapidae. Estes são classificados em quatro tipos: **acidentes botrópicos** (acidentes com serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* - jararaca, jararacuçu, urutu, caíçaca, comboia); **acidentes crotálicos** (acidentes com serpentes do gênero *Crotalus* - cascavel); **acidentes laquéticos** (acidentes com serpentes do gênero *Lachesis* - surucucu-pico-de-jaca); **acidente elapídico** (acidentes com serpentes dos gêneros *Micrurus* e *Leptomicrurus* – coral - verdadeira) (Ministério da Saúde, 2018). A **figura 1** apresenta o percentual de acidentes ofídicos notificados de acordo com o gênero.

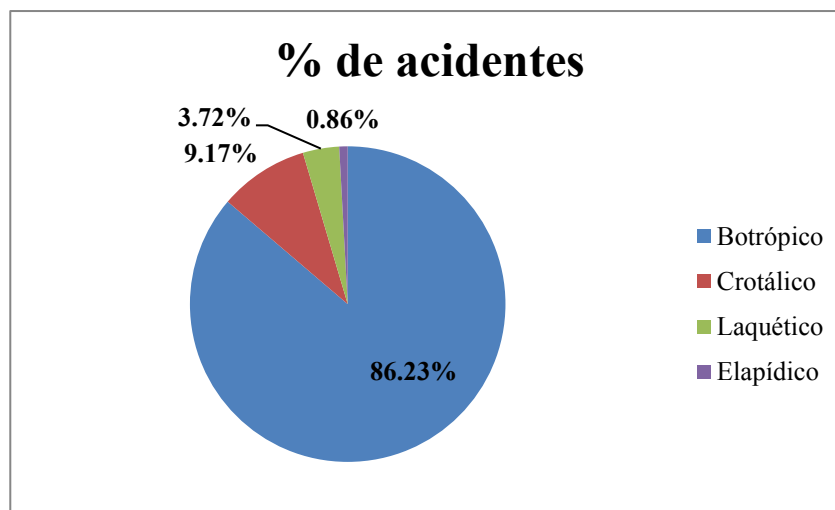


Figura 1: Porcentagem de acidentes notificados de acordo com o gênero: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus*. (Adaptado de DA SILVA, 2015)

As serpentes do gênero *Bothrops* são responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos, devido à abundância e ampla distribuição dessas serpentes no território brasileiro (BERNARDE, ALBUQUERQUE e TURCI, 2012). A peçonha de serpentes desse gênero é composta em sua grande maioria por toxinas, sendo mais de 90% proteínas, as quais são majoritariamente enzimas como metaloproteases, fosfolipases A₂, serinoproteases, L-aminoácido oxidases (CALVETE, JUÁREZ e SANZ, 2007). Sendo assim o objetivo de muitos soros antiofídicos é neutralizar essas toxinas, dentre as quais se destacam as fosfolipases A₂ (PLA₂) (CUNHA e MARTINS, 2012).

1.2. Classificação e características estruturais e funcionais das PLA₂s

As fosfolipases são enzimas amplamente distribuídas nos organismos vivos com capacidade de hidrolisar fosfolipídeos de membrana. 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).

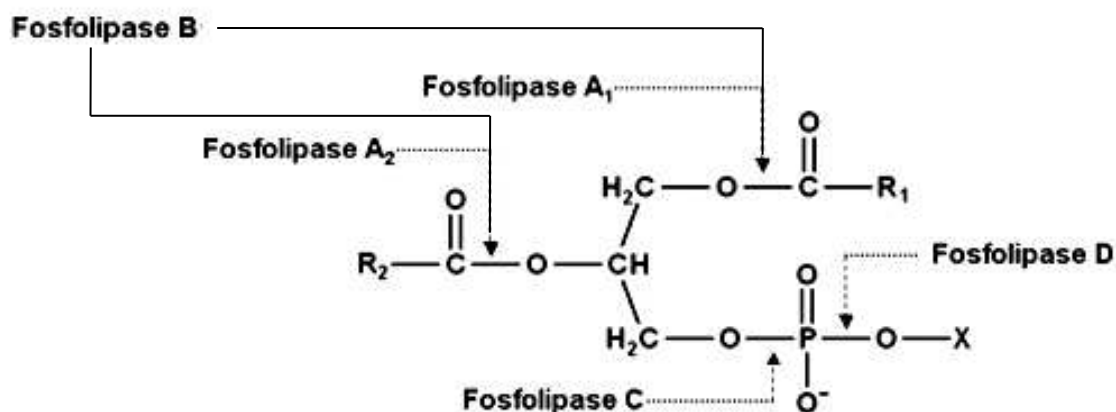


Figura 2: Cinco tipos de fosfolipases e seus respectivos sítios de clivagem. (Fonte: KINI, 1997).

As PLA₂s são enzimas responsáveis principalmente pela hidrólise da ligação 2-acil-éster de fosfolipídios de membrana, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídios. O excesso de ácido araquidônico, produto de sua atividade catalítica, é precursor de mediadores lipídicos da inflamação, tais como prostaglandinas, prostaciclina, tromboxanos e leucotrienos; causando, assim, uma reação inflamatória (TEIXEIRA et. al., 2003).

As PLA₂ podem ser separadas em seis principais grupos: PLA₂ secretadas (sPLA₂), PLA₂ citosólicas (cPLA₂), PLA₂ independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), PAF acetilhidrolases (PAF-AH), PLA₂s lisossomais e PLA₂s específica do tecido adiposo (AdPLA) (SCHALOSKE e DENNIS, 2006; DENNIS et. al., 2011).

As sPLA₂ são proteínas pequenas que variam de 14 a 18 kDa, apresentam de 5 a 8 pontes de dissulfeto sendo necessárias para que haja atividade catalítica, uma histidina conservada na posição 48 e a presença de cálcio (cofator essencial). As sPLA₂ são subdivididas em dezesseis subgrupos, sendo que o subgrupo I-A e II-A são representantes das PLA₂ presentes em peçonhas de serpentes, incluindo as famílias Elapidae, Viperidae e Crotalidae, respectivamente (SCHALOSKE e DENNIS, 2006; DENNIS et. al., 2011).

As sPLA₂ do grupo II-A pertencentes a família Viperidae são divididas em dois grupos principais: 1) cataliticamente ativas: PLA₂s que possuem um sítio de ligação ao cálcio o qual é coordenado pelo grupo β-carboxílico do resíduo Asp49, 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⁺; 2) cataliticamente inativas: substituição do resíduo Asp49 (cadeia lateral negativa) por Lys49 (cadeia lateral positivo) altera significativamente o sítio de ligação de Ca²⁺ nas PLA₂, impedindo a ligação deste íon e resultando em baixa ou inexistente atividade catalítica (**fig. 3**) (ARNI et. al., 1996; SOARES et. al., 2000; BURKE e DENNIS, 2009; DOS SANTOS et. al., 2009). As PLA₂ Asp49 podem ainda ser subdivididas em básicas (pI próximo a 8,0) e ácidas (pI próximo a 4,0), devido a presença de um conteúdo maior de resíduos de aminoácidos básicos e ácidos, respectivamente em suas estruturas (ÖHLER et. al., 2010).

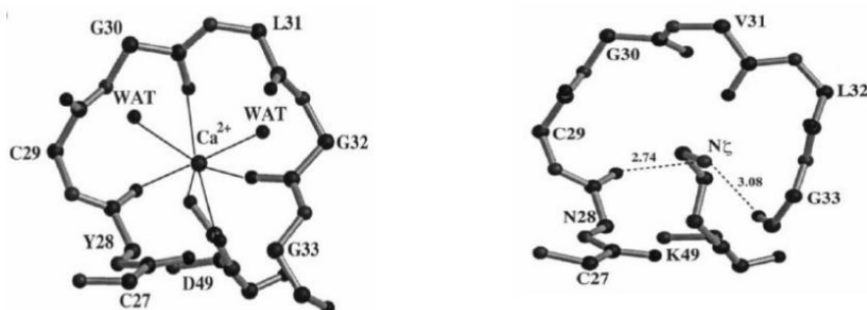


Figura 3: Representação do sítio catalítico de uma PLA₂ com o aminoácido Asp na posição 49(à esquerda) e com Lys na posição 49 (à direita). (Fonte: ARNI e WARD, 1996)

Há outras mutações que são responsáveis por essa modificação no sítio ativo (**Fig. 3**), os aminoácidos que ocupam as posições 28, 31 e 32 na Asp49 são Tyr, Leu e Gly, já no sítio das Lys49 observa-se que essas posições são ocupadas pelos aminoácidos Asn, Val e Leu (ARNI e WARD, 1996, FERNANDES et. al., 2010, FERNANDES et. al., 2013). Contudo mesmo não possuindo atividade catalítica as Lys49 apresentam a estrutura terciária semelhante às das PLA₂s catalíticas, sendo assim, as diferenças na conformação oligomérica e sítios funcionais dão a essas fosfolipases suas diferentes funções que causam citotoxicidade nas células (DOS SANTOS et. al., 2009; FERNANDES et. al., 2014; BORGES et. al., 2017).

As PLA₂s possuem uma estrutura terciária típica enovelada da seguinte forma: I) alfa hélice N-terminal; II) uma “curta” hélice; III) loop de ligação para o cálcio; IV) duas alfas

hélices antiparalelas; V) uma folha beta anti-paralela; e VI) um loop C-terminal (**Fig. 4**) (CORRÊA et. al., 2008; DE LIMA et. al., 2017).

As fosfolipases A₂ em solução apresentam-se em formas oligoméricas, geralmente em dímeros (**Fig. 5**), sendo esse estado essencial para a sua atividade tóxica (ANGULO et. al., 2005). Assim, existem os dímeros convencionais que se estabilizam através de interações entre as folhas betas e resíduos da alfa hélice N-terminal (ARNI et. al., 1995; MAGRO et. al., 2003); e os dímeros alternativos que se estabilizam por meio do contato entre os *loops* de ligação de cálcio e os C-terminais formando uma via de conexão entre os sítios ativos de ambos os monômeros (MURAKAMI et. al., 2007), sendo o aminoácido Tyr119 o responsável por manter essa conformação (DOS SANTOS et. al., 2009).

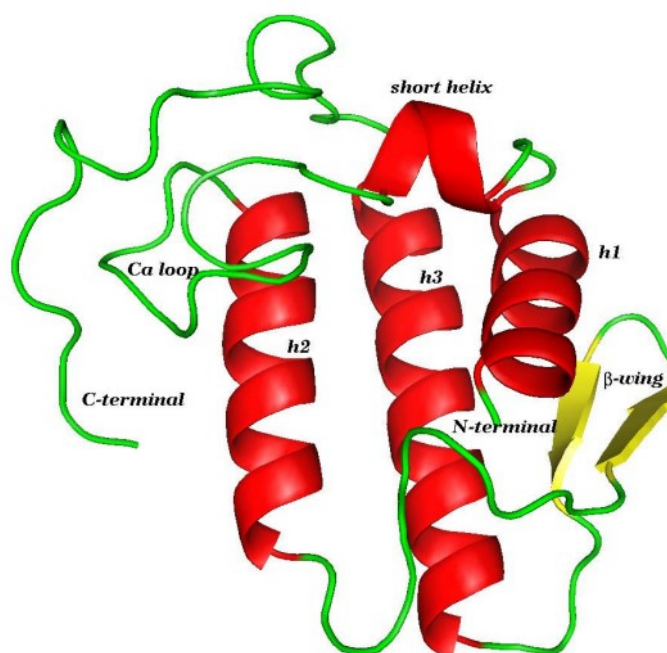


Figura 4: Representação esquemática do enovelamento de um monômero de PLA₂. (Fonte: CORRÊA, 2007)

As PLA₂s-Lys49 apresentam um mecanismo citotóxico independente da atividade catalítica. FERNANDES e colaboradores (2013) realizaram estudos estruturais com as PLA₂-Lys49 BbTX-II e MTX-II isoladas de *B. brazili*, demonstrando que quando um ligante está presente no canal hidrofóbico dessas enzimas, ocorre uma reorientação das cadeias laterais presentes nas regiões N e C-terminais que expõe aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos para o mesmo plano, em posições simétricas, em ambos os monômeros. Os aminoácidos nas posições Lys20, Lys115 e Arg118 são responsáveis pela ancoragem da enzima na membrana (*Membrane-Docking Site* ou MDoS) e os aminoácidos Leu121 e Phe125 são responsáveis

pela desestabilização da membrana (*Membrane-Disruption Site* ou MDiS), fazendo assim com que a enzima passe do estado “inativo” para o “ativo”, assumindo assim a conformação do dímero alternativo.

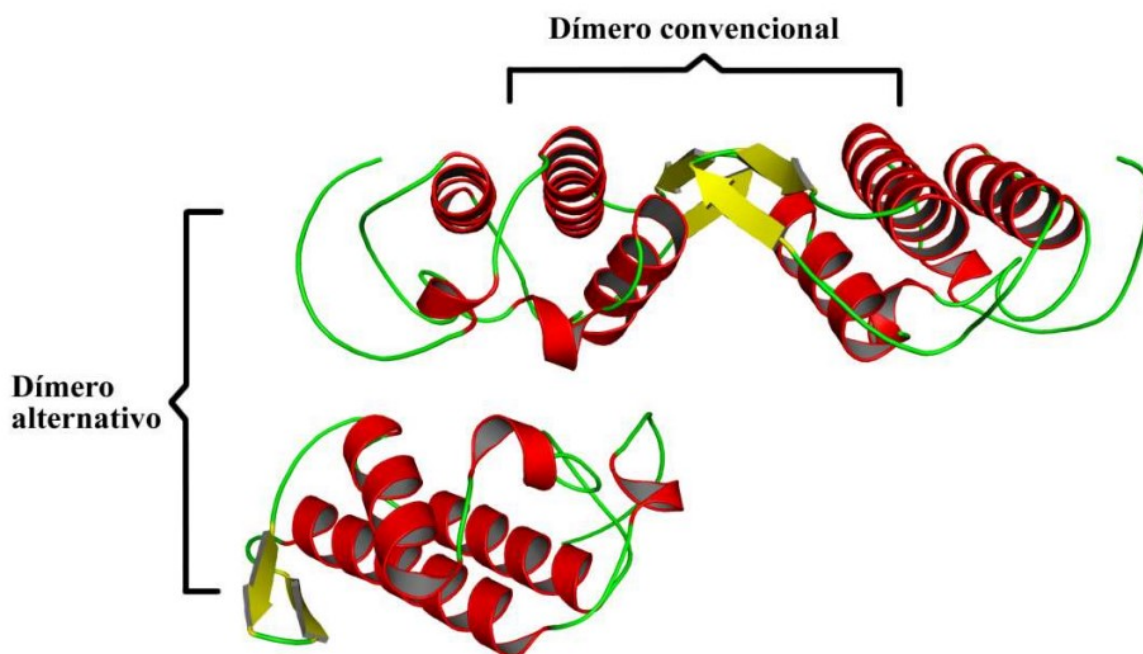


Figura 5: Representação dos dois tipos de dímeros de PLA₂. (Fonte: SALVADOR, 2016)

A região C-terminal das PLA₂s Lys49 é conservada na maioria das enzimas dessa classe, a qual apresenta características básicas e hidrofóbicas capazes de interagir com as membranas celulares gerando seu efeito tóxico (FERNANDES et. al., 2013). Dada a importância da região C-terminal para a atividade miotóxica das PLA₂Lys49, muitos pesquisadores desenvolveram peptídeos sintéticos derivados dessa região para estudar suas propriedades e o potencial de causar alguns dos efeitos tóxicos que a toxina completa é capaz de induzir.

LOMONTE e colaboradores (1994) sintetizaram um peptídeo derivado da região C-terminal (sequência dos aminoácidos entre as posições 115 a 129 – KKYRYYLKPLCKK) a partir da miotoxina II isolada de *B. asper*, o qual apresentou rápida atividade citolítica *in vitro*. CINTRA-FRANCISCHINELLI e colaboradores (2010) demonstraram a capacidade de peptídeos derivados da região C-terminal de uma PLA₂ Lys49 isolada da peçonha de *A. contortrix laticinctus* de causar miotoxicidade. Sendo assim, estudos que se seguiram comprovaram esse potencial e demonstram que as características anfipáticas dos peptídeos, devido à presença de aminoácidos catiônicos e hidrofóbicos, garantem a propriedade destes de permearem membranas (KINI et. al., 1989; LOMONTE et. al., 2010).

Os achados de DOS SANTOS e colaboradores em 2009, induziram a uma possível associação entre as Asp49 e as Lys49, onde o produto da degradação das enzimas catalíticas, os ácidos graxos são importantes para as PLA₂-Lys49 adquirirem sua conformação “ativa”. Sendo assim, MORA-OBANDO e colaboradores (2014) demonstraram esse sinergismo entre os dois tipos de enzimas presentes na peçonha de *B. asper* e, além disso, que a região C-terminal apresenta essa mesma capacidade.

O conhecimento das atividades desses peptídeos ao longo dos anos demonstrou potencial para o desenvolvimento de novos fármacos para tratar várias doenças, pois esses peptídeos apresentaram propriedades bactericida, antifúngica, anti-leishmanial e antitumoral (LOMONTE et. al., 2010; SANTOS-FILHO et. al., 2015; ALMEIDA et. al., 2018). Adicionalmente, estes estudos permitem entender a importância dessa região para essas enzimas o que pode ser alvo farmacológico para o tratamento de acidentes antiofídicos devido ao alto nível de conservação (Fig.6).

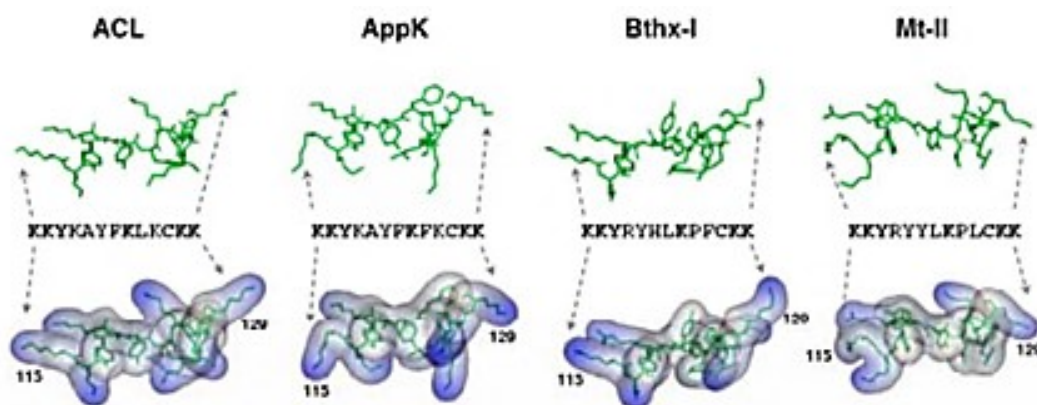


Figura 6: Regiões C-terminais conservadas nas PLA₂s Lys49 ACL (*Agkistrodon contortrix laticinctus*), AppK (*Agkistrodon piscivorus piscivorus*), BThTX-I (*Bothrops jararacussu*), e MT-II (*Bothrops asper*). (Fonte: LOMONTE, 2010)

As PLA₂ botrópicas são denominadas, na maioria das peçonhas, como miotoxinas devido à capacidade de promover o influxo de Ca⁺² ativando assim vias metabólicas, principalmente enzimas Ca⁺²-dependentes, que causam danos irreversíveis as células levando-as a morte, especialmente de células musculares, apresentando assim efeitos biológicos como induzir o bloqueio neuromuscular, inflamação, danos ao sarcolema, edema, mionecrose, entre outros (LOMONTE et. al., 2010; SANTOS-FILHO et. al., 2015; SALVADOR, 2016).

As PLA₂s botrópicas foram isoladas ao longo dos anos, com a finalidade de serem caracterizadas bioquimicamente, funcionalmente e estruturalmente. As PLA₂s Lys49 apresentam esses vários efeitos descritos anteriormente mesmo sem a atividade catalítica o que desperta, até os dias atuais, o interesse por essas enzimas tanto devido ao seu potencial farmacêutico como para procura por inibidores para melhorar o tratamento de acidentes ofídicos (**tabela 1**) (SOARES et. al., 2000; CORREA et. al., 2016; GRABNER et. al., 2017).

Tabela 1: PLA₂s Asp49 e Lys49 isoladas de espécies do gênero *Bothrops*.

Toxinas	Espécie	ID	Referencia
BnSP-6	<i>Bothrops pauloensis</i>	1PC9	MAGRO et. al., 2003
BnSP-7	<i>Bothrops pauloensis</i>	1PA0	MAGRO et. al., 2003
BThTX-I	<i>Bothrops jararacussu</i>	3HZD	FERNANDES et. al., 2010
BThTX-II	<i>Bothrops jararacussu</i>	2OQD	CORREA et. al., 2008
MjTX-II	<i>Bothrops moojeni</i>	4KF3	SALVADOR et. al., 2013
MTX-II	<i>Bothrops brazili</i>	4K06	FERNANDES et.al., 2013
BbTX-I	<i>Bothrops brazili</i>	4K09	FERNANDES et.al., 2013
Myo-II	<i>Bothrops asper</i>	1CLP	ARNI et. al., 1995
MT-I	<i>Bothrops asper</i>	5TFV	SALVADOR et. al., 2017
PrTX-I	<i>Bothrops pirajai</i>	2Q2J	DOS SANTOS et. al., 2009

A PLA₂ Lys49 BnSP-7 foi isolada a partir da peçonha de *Bothrops pauloensis* por RODRIGUES e colaboradores (1998) e sua estrutura tridimensional foi adquirida por SOARES e colaboradores em 2000. Esta proteína também apresenta aminoácidos conservados em sua estrutura primária, tanto na porção N-terminal quanto na porção C-terminal, que são responsáveis por causar seus efeitos tóxicos como inflamação, miotoxicidade e edema (BORGES et. al., 1997; OLIVEIRA, et. al., 2009), rompimento de lipossomas (SOARES et. al., 2000), bloqueio neuromuscular (SOARES et. al., 2000), atividade bactericida sobre bactérias gram-negativa (SOARES et. al., 2000 e 2004), atividade antiparasitária contra *Leishmania amazonensis* (NUNES et. al., 2013) e *Toxoplasma gondii* (BORGES et. al., 2016).

1.3. Soroterapia em acidentes ofídicos

A soroterapia consiste na produção de anticorpos neutralizantes contra determinado(s) antígeno(s). O antígeno contém diferentes regiões antigênicas (epítomos) capazes de gerar uma resposta imune. De acordo com PETERS e colaboradores (2005), epítomo é uma região de determinado antígeno capaz de ser reconhecida tanto por um anticorpo como por um receptor de linfócito B.

Durante a resposta do sistema imune adaptativo a determinado antígeno, os linfócitos B são capazes de gerar uma resposta humoral (capacidade em gerar anticorpos), quando um epítomo é reconhecido por seu receptor de membrana (BCR), tornando essas células ativas e estimulando-as a se proliferarem. O reconhecimento de diferentes epítomos por células B distintas induz a expressão de receptores com variações em torno do receptor original que se combinam ao antígeno com afinidades variadas, onde as células que apresentam maior afinidade antígeno-receptor continuam o processo de proliferação e diferenciação em plasmócitos para a produção de anticorpos neutralizantes, sendo essa seleção natural na direção de um reconhecimento de alta especificidade, denominada seleção clonal (MURPHY et. al., 2008). O primeiro contato das células que nunca foram expostas ao antígeno estimula a produção de anticorpos IgM em maiores quantidades quando comparada aos IgGs, mas a medida que ocorre outras exposições ocorre a soroconversão onde a produção de IgG é aumentada e a afinidade pelo antígeno é maior, possibilitando melhor neutralização (ABBAS et. al., 2012).

A produção do soro antiofídico ocorre através da imunização de mamíferos (geralmente cavalos) que são expostos à peçonha bruta (ou seja, a um pool de proteínas) produzindo imunoglobulinas, através do sistema imune adaptativo, as quais são aplicadas para uso comercial (WHO, 2010). Os soros antiofídicos, podem apresentar uma composição monovalente, que é a produção de IgGs com apenas a utilização da peçonha de uma espécie, ou polivalente com a utilização de peçonhas de várias espécies (ISBISTER et. al., 2010; CAMPLESI et. al., 2017).

O soro antiofídico obtido pela imunização de animais de grande porte como equinos é o método mais utilizado no tratamento do acidente ofídico. Neste procedimento, os animais por serem expostos a peçonha bruta, há o contato tanto com toxinas como com componentes proteicos não tóxicos, havendo a produção de anticorpos sem função neutralizante que estarão presentes no soro interferindo com a qualidade e potencial de neutralização da

peçonha (GUIDOLIN et. al., 2013). Assim há a injeção de grande quantidade de IgGs (relevantes ou não relevantes) nos pacientes (SEGURA et. al., 2013).

A interação dos anticorpos com os componentes (sejam estes da peçonha ou não) formam imunocomplexos solúveis que se depositam nos capilares de menor calibre e são capazes de ativar o sistema complemento, provocando uma reação inflamatória local exacerbada que provoca uma lesão tecidual e gera, assim, uma reação de hipersensibilidade chamada *Doença do Soro*, limitando o uso de IgGs de mamíferos na soroterapia (NAGAO-DIAS et. al., 2004; BARREIRA & GOMES, 2013). Devido a esse efeito as pessoas podem usar o soro poucas vezes, dessa forma é crescente o interesse científico na busca de novas alternativas para o tratamento do envenenamento ofídico (AGUILAR et. al., 2014; CARDOSO et. al., 2018).

A disponibilidade de soros antiofídicos com base em sistemas de mamíferos também encontra limitações quanto a produção em larga escala (GUTIÉRREZ et. al., 2013), além dos custos altos de produção devido a manutenção dos animais (SCHADE et. al., 2005; DIAS DA SILVA & TAMBOURGI, 2010) e preocupação com o bem estar animal, induzindo, assim, a busca por novas técnicas que visam melhorar a produção dos soros e diminuir os custos (DA ROCHA et. al. 2017).

Kemplerer em 1893 descreveu a presença de proteínas neutralizantes na gema do ovo de galinhas previamente imunizadas e desde então novos conhecimentos vem surgindo no entendimento das funções biológicas das imunoglobulinas presentes em aves denominadas de IgY (ERHARD et. al., 2001). Assim, os ovos de galinhas imunizadas podem ser importantes reservatórios de anticorpos policlonais que reconhecem uma série de antígenos diferentes, possuindo várias aplicações terapêuticas (ALMEIDA et. al., 2008; XU et. al., 2011; JUNIOR et. al., 2012; TEIMOORI et. al., 2016).

O uso de galinhas para a produção de anticorpos apresenta vantagens em relação ao sistema de mamíferos quanto as seguintes características: o rendimento de anticorpos para a purificação é maior em galinhas do que no sistema de produção de IgG em mamíferos (SHENG et. al., 2015); não interagem com receptores para fragmento Fc e nem com proteínas do sistema complemento de mamíferos devido a diferenças estruturais na porção Fc (**Fig. 7**) (SCHADE et. al., 2005); não se ligam a proteína A de *Staphylococcus aureus* e proteína G de *Streptococcus* ssp. evitando a ocorrência de falso-positivo em imunoensaios (ERHARD et. al., 2001; KARLSSON, KOLLBERG, LARSSON, 2004).

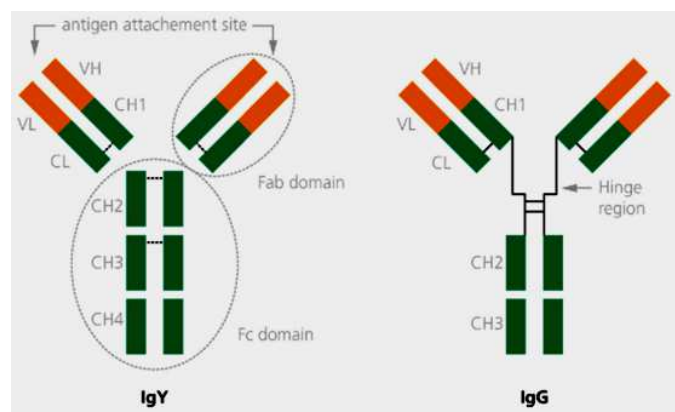


Figura 7: Diferença entre as porções Fc dos anticorpos IgG (a qual apresenta duas cadeias pesadas e uma região flexível) e IgY (a qual apresenta três cadeias pesadas e nenhuma região flexível). (Fonte: MUELLER et. al., 2015)

Recentemente BORGES (2018) e colaboradores utilizaram a PLA₂ BnSP-7 isolada da peçonha de *B. pauloensis* como antígeno para a produção de anticorpos policlonais anti-BnSP-7. Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 foram capazes de reconhecer a proteína nativa, bem como outras toxinas (PLA₂Lys49 e Asp49) isoladas de peçonhas de diferentes espécies de serpentes, mostrando um grande potencial de neutralização de PLA₂s presentes em diferentes peçonhas ofídicas. Adicionalmente, neste mesmo trabalho foi demonstrado que os anticorpos IgY anti-BnSP-7 apresentaram efeitos antiparasitários sobre formas taquizoitas de *Toxoplasma gondii* e promastigotas de *Leishmania L. amazonensis*. De acordo com esses resultados prévios demonstrados por BORGES e colaboradores (2018) torna-se relevante avaliar a capacidade de reconhecimento dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 sobre diferentes peçonhas ofídicas e toxinas isoladas, a fim de validar sua utilização como uma estratégia auxiliar na soroterapia de envenenamentos botrópicos. Estudos utilizando anticorpos anti-PLA₂s são importantes para se entender melhor a estrutura dessa classe de proteínas não somente presentes em peçonhas ofídicas, mas também em outros organismos vivos, permitindo o surgimento de novas pesquisas que visam o entendimento de patologias cujas PLA₂s estejam envolvidas.

2.0 OBJETIVOS

2.1. Objetivo geral

- O objetivo geral do presente estudo foi demonstrar a reatividade cruzada de anticorpos policlonais (IgY) anti-BnSP-7 sobre diferentes peçonhas ofídicas e toxinas isoladas, bem como realizar uma predição *in silico* de epítomos de células B presentes na estrutura da PLA₂-Lys49 BnSP-7.

2.2. Objetivos específicos

- Avaliar o perfil eletroforético de diferentes peçonhas botrópicas (*B. atrox*, *B. diporus*, *B. marajoensis*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. pauloensis*, *B. brazili*) e crotálicas (*Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella*), por meio de SDS-PAGE em condições redutoras.
- Avaliar a reatividade cruzada por meio de ELISA entre os anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com as peçonhas de *B. pauloensis*, *B. moojeni*, *B. jararacussu*, *B. marajoensis*, *B. diporus*, *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. brazili*.
- Avaliar a reatividade cruzada por meio de ELISA entre os anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com as PLA₂s isoladas das peçonhas de *B. pauloensis* (BnSP-6 e BnSP-7), *B. jararacussu* (BThTX-I e BThTX-II) e *B. moojeni* (MjTX-II).
- Realizar alinhamentos globais, através da plataforma online Emboss Needle, entre as estruturas primárias da PLA₂BnSP-7 e PLA₂s Lys49 e Asp49 depositadas nos bancos de dados de proteínas (NCBI e UniProt) para a aquisição do percentual de identidades e similaridade.
- Determinar os domínios conservados entre as estruturas primárias da PLA₂ BnSP-7 e BnSP-6, BThTX-I e MjTX-II por meio de alinhamento múltiplo através do programa MEGA, ferramenta ClustaW.
- Realizar análises de predição *in silico* de epítomos de células B presentes na estrutura da PLA₂-Lys49 BnSP-7 utilizando as plataformas IEDB, Bcepred e Bepipred.

- Realizar a sobreposição das estruturas tridimensionais das PLA₂s BThTX-I, BThTX-II com a BnSP-7 para se obter os valores de RMSD e TMscore que possam indicar a semelhança estrutural quanto ao enovelamento entre essas toxinas utilizando o servidor online do Raptor X Structure Alignment.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção das peçonhas

As peçonhas de *B. diporus*, *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu* e *B. pauloensis* foram obtidas a partir de espécimes mantidas no Serpentário CETA- Centro de Extração de Toxinas Animais Ltda - CNPJ: 08.972.260/0001-30, estabelecido na estrada municipal Couto e Silvas - Sítio São Jorge Silvas - Morungaba, SP - CEP: 13260-000. Este serpentário possui comprovante de registro no Instituto Brasileiro do Meio Ambiente e dos Recursos Naturais Renováveis (cadastro: 2087163). As peçonhas de *B. atrox*, *B. brazili*, *B. marajoensis*, *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus cascavella* foram doadas pelo Dr. Andreimar Martins Soares do Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas à Saúde (CEBio) Fundação Oswaldo Cruz, FIOCRUZ, Rondônia, Porto Velho-RO, Brasil.

As toxinas BnSP-6, BnSP-7, BThTX-I, BThTX-II, MjTX-I e MjTX-II foram obtidas a partir do banco de Peçonhas e Toxinas Ofídicas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia

3.2. Obtenção do anticorpo IgY anti-BnSP-7

Os anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 foram obtidos do banco de Peçonhas e Toxinas Ofídicas do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais do Instituto de Biotecnologia da Universidade Federal de Uberlândia. Estes foram produzidos em galinhas *Gallus gallus domesticus*, purificados a partir de colunas de afinidade HiTrapIgYHP e armazenados a -20° C de acordo com BORGES et. al., 2018.

3.3. Dosagem das proteínas

A determinação da concentração de proteínas foi realizada conforme o método descrito por Bradford (1976), com modificações. Amostras contendo 1µL de peçonhas, anticorpos ou toxinas e 49µL de água Milli Q foram adicionadas a 150µL do reagente de Bradford (100 mg de Comassie Blue G, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e água deionizada suficiente para completar 1L de solução), após 10 min as amostras foram lidas a absorbância 595nm. A curva padrão de soroalbumina bovina (2mg/mL) foi construída para análise de regressão linear dos dados. Desse modo, a concentração das

proteínas ($\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

3.4. Eletroforese em géis de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses em géis de poliacrilamida foram realizadas com as amostras sob condições redutoras de acordo com o método de Laemmli (1970). O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu em gel de empilhamento a 3% (contendo Tris-HCl 0,5M pH 6,8 e SDS a 10%) e gel de separação a 12,5% (contendo Tris-HCl 2,0M pH 8,8 e SDS 10%) mantendo a relação de Bis: Acrilamida 0,8:30 (v/v). Todos os géis foram preparados num sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical.

As amostras contendo as peçonhas ou toxinas (20 μg) foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M pH 6,8; Glicerol a 10% (v/v); β -mercaptoetanol 5% (v/v); 2% de SDS (m/v) e 0,001% de azul de bromofenol (m/v) e aquecidas a 100°C por 5 minutos em banho-maria seco e aplicadas ao gel de eletroforese. O tampão de corrida consistia de Tris-HCl 0,025M, SDS 0,1%, pH 8,3. A eletroforese foi realizada em corrente de 12 mA (para um gel) até o indicador azul de bromofenol alcançar o final do gel. Após a corrida os géis foram corados em uma solução de Coomassie Blue - R250 0,1% em água, ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) e descorado em solução de ácido acético a 7% (v/v) e etanol 30% (v/v) para posterior análise. O padrão de massa molecular utilizado foi da *GE Healthcare*, que apresenta as seguintes proteínas Fosforilase B (97kDa), Albumina (66 kDa), Ovalbumina (45 kDa), Anidrase Carbônica (30kDa), Inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -Lactalbumina (14,4 kDa).

3.5. Ensaio de reatividade cruzada por ELISA

O ensaio de ELISA foi realizado em triplicata, utilizando as amostras (10 $\mu\text{g}/\text{mL}$) das seguintes peçonhas brutas (*B. diporus*, *B. marajoensis*, *B. alternatus*, *B. moojeni*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. pauloensis*, *B. brazili*) e toxinas (BnSP-6, MjTX-II, BThTX-I, BThTX-II, BnSP-7) ressuspendidas em água, as quais foram diluídas em tampão bicarbonato (0,06mM em pH 9,6), sendo essa solução utilizada para a sensibilização de uma placa de 96 poços *overnight* a 4°C. Após a sensibilização, a placa foi lavada em PBS-Tween 0,05% (PBS-T) três vezes e em seguida bloqueada com leite em pó desnatado a 3% solubilizado em PBS-T (PBS-T-LP) por 1 hora a 37° C. Após o bloqueio, os poços foram lavados como descrito

anteriormente para a remoção da solução de bloqueio retirando excesso de leite e posteriormente foi adicionado o anticorpo IgY anti- BnSP-7 (2 µg/mL) em PBS-T-LP a 3%, sendo a placa posteriormente incubada por mais 1 h a 37° C. A placa foi lavada novamente após esse período com PBS-T e adicionado o anticorpo secundário anti-IgY conjugado com a enzima peroxidase diluído em PBS-T-LP 1:10000 sendo incubado por mais 1 h a 37° C. A última lavagem foi realizada e a solução cromogênica ortofenileno-diamina (OPD) diluída em tampão de substrato (1g/mL) foi adicionada para a revelação da reação após 20 minutos, sendo essa reação interrompida com H₂SO₄ a 0,1M e a leitura da placa realizada com um leitor de microplacas na absorbância a 495nm. O índice ELISA (IE) foi determinado de acordo com a seguinte equação: OD/*cut-off* do controle negativo mais três desvios padrão. Para estabelecer o valor de *cut-off*, foram utilizadas a OD do grupo controle (galinhas imunizadas com PBS). Valores de IE acima de 1.2 foram considerados positivos.

3.6. Seleção de epítomos de células B e sobreposição de estruturas 3D

O Emboss Needle (https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/emboss_needle) é uma plataforma online que permite a realização de alinhamentos globais entre cadeias lineares de aminoácidos e nucleotídeos permitindo assim que a obtenção do percentual de identidade e similaridade entre essas sequências. O programa Molecular Evolutionary Genetic Analysis (MEGA versão 5) foi utilizado para o alinhamento múltiplo entre a BnSP-7 e as miotoxinas BnSP-6, BThTX-I e MjTX-II, através da ferramenta ClustalW.

Para a seleção de possíveis epítomos de célula B foram utilizadas as seguintes plataformas online IEDB (<https://www.iedb.org/>), Bcepred (<http://crdd.osdd.net/raghava/bcepred/>) e Bepipred (<http://www.cbs.dtu.dk/services/BepiPred/>). Através de uma plataforma *online* de alinhamento múltiplo chamado Raptor X Structure Alignment Server (<http://raptorx.uchicago.edu/DeepAlign/submit/>) foi realizada uma sobreposição e alinhamento das estruturas 3D. As imagens tridimensionais apresentadas foram visualizadas e modificadas através do programa UCSF Chimera.

3.7. Análise estatística

A análise estatística foi calculada pela média dos valores das triplicatas da densidade óptica (DO) e dos valores de IE. Foi aplicado sobre os grupos um teste de normalidade, a

partir dele, foram avaliados estatisticamente de forma não paramétrica através do teste *One way* ANOVA. Para toda análise foi fixado o nível de significância de 0,5% ($p < 0,05$).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1. Análise do perfil eletroforético das peçonhas botrópicas e crotálicas por SDS - PAGE em condições redutoras

As peçonhas de serpentes são constituídas por uma mistura complexa de componentes orgânicos e inorgânicos. Dentre os compostos orgânicos as proteínas são a grande maioria, com moléculas que possuem massas moleculares variando de 14 a 100 kDa, as quais pertencem a diferentes famílias de toxinas como as PLA₂s que apresentam uma variedade de isoformas (CARDOSO et. al., 2010; TASOULIS E ISBISTER, 2017; KOHLHOF et. al., 2012; MELANI et. al., 2015).

A **figura 8** apresenta o perfil eletroforético em SDS-PAGE em condições redutoras de diferentes peçonhas (*B. moojeni*; *B. jararaca*; *B. jararacussu*; *C.d. cascavela*; *C.d. terrificus*; *B. atrox*; *B. diporus*; *B. alternatus*; *B. pauloensis*; *B. brazili*; *B. marajoensis*). Estas peçonhas apresentam-se bastante heterogêneas devido a grande presença de proteínas de diferentes massas moleculares. Destaca-se também a presença de bandas protéicas na faixa de 14,4 a 20,1 kDa. A **tabela 2** demonstra as massas moleculares de PLA₂s isoladas das peçonhas de *B. moojeni*; *B. jararaca*; *B. jararacussu*; *C.d. cascavela*; *C.d. terrificus*; *B. atrox*; *B. diporus*; *B. alternatus*; *B. pauloensis*; *B. brazili*; *B. marajoensis*. Como pode ser observado, as diferentes PLA₂s apresentam massas moleculares semelhantes variando de 14 a 17 kDa corroborando com o perfil eletroforético apresentado na **figura 8**.

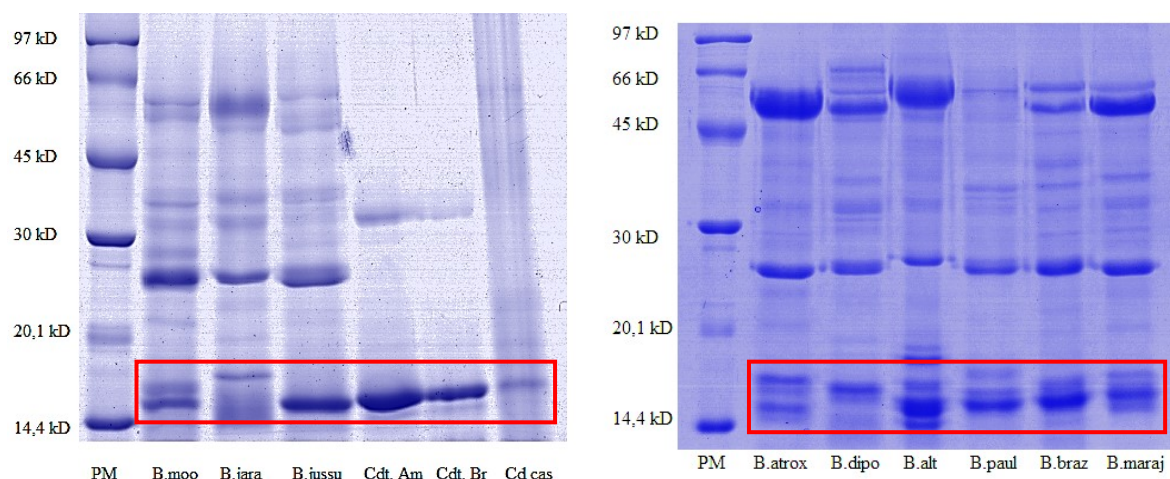


Figura 8: Eletroforese em gel de poliacrilamida (12,5%) SDS-PAGE de 20µg das peçonhas botrópicas e crotálicas em condições redutoras na presença de β-mercaptoetanol. Tempo de corrida 100 min. a 12mA. O gel foi corado com Coomassie Brilliant Blue R-250 0,2% em água, ácido acético 10% (v/v) e metanol 50% (v/v) e descorado em solução de ácido acético a 7% (v/v) e etanol 30% (v/v). Destacado em vermelho a banda das PLA₂. (**B.moo** - *B. moojeni*; **B.jara** - *B. jararaca*; **B.jussu** - *B. jararacussu*; **C.d.t. Am** - *Crotalus durissus terrificus* do tipo amarela; **C.d.t. Br** - *Crotalus durissus terrificus* do tipo branca; **C.d.cas** - *Crotalus durissus cascavela*; **B.atrox** - *B. atrox*; **B.dipo** - *B. diporus*; **B.alt** - *B. alternatus*; **B.paul** - *B. pauloensis*; **B.braz** - *B. brasiliensis*; **B.maraj** - *B. marajoensis*). **PM** - Padrão de peso molecular (Fosforilase B - 97 kDa; Albumina - 66 kDa; Ovoalbumina - 45 kDa; Anidrase Carbônica- 30 kD; Inibidor de tripsina - 20,1 kDa; α-lactoalbumina - 14,4 kDa)

Tabela 2: Massas moleculares de PLA₂ presentes nas espécies dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus*.

Espécie	Massa molecular (kDa)	Referência
<i>B. moojeni</i>	17	AMORIM et.al., 2018
<i>B. jararaca</i>	14	GONÇALVES-MACHADO et. al.,2016
<i>B. jararacussu</i>	14	CORREA, 2007
<i>B. alternatus</i>	14-15	ÖHLER et. al., 2010
<i>B. diporus</i>	14	GAY et. al., 2016
<i>B.atrox</i>	15-17	KOHLHOFF et. al., 2012
<i>B. pauloensis</i>	14	LIMA, 2013
<i>C. d. terrificus</i>	14	CAMPOS, 2006
<i>C. d. cascavela</i>	15	BEGHINI, 2001
<i>B. marajoensis</i>	14	PONCE-SOTO et. al., 2010
<i>B. brasili</i>	14	SOBRINHO, 2014

4.2. Análise da reatividade cruzada (ELISA)

A capacidade dos anticorpos IgY anti-BnSP-7 reconhecerem componentes protéicos presentes em diferentes peçonhas foi avaliada pelo teste de ELISA. A reatividade cruzada do anticorpo anti-BnSP-7 foi maior em ordem decrescente para as peçonhas de *B. pauloensis*, *B. moojeni*, *B. jararacussu* e *B. marajoensis*, as quais apresentaram os respectivos Índices ELISA (IE) 17,6; 16,8; 15,7; 12,5 (**Fig.9**).

A espécie *B. pauloensis* apresentou o maior valor de IE (**Fig.9**), isto provavelmente se deve ao reconhecimento do próprio antígeno específico (PLA₂ BnSP-7) presente nesta peçonha, além da presença de isoformas (como a BnSP-6) que possuem alta homologia estrutural com a BnSP-7 e foram isoladas da mesma peçonha (RODRIGUES et. al. 1998). RODRIGUES e colaboradores (2012) demonstraram por análise proteômica da peçonha e do transcriptoma da glândula da serpente *B. pauloensis*, que a família das PLA₂s corresponde a segunda maior classe de toxinas (26 - 32%) predominante no repertório protéico da peçonha desta espécie, sendo que deste percentual 16,4% correspondem as PLA₂s Lys49 e 15,9% são PLA₂s Asp49.

De acordo com estudos proteômicos a espécie *B. jararacussu* também é enriquecida em PLA₂s apresentando de 25,7% a 35% de todo o conteúdo total de toxinas da peçonha, sendo a grande maioria toxinas básicas e homólogas a BnSP-7, como a BThTX-I e II (KASHIMA et. al., 2004; SOUSA et. al., 2013). Recentemente foram publicados os primeiros estudos que apresentaram a venômica da peçonha de *B. moojeni* demonstrando um conteúdo de fosfolipases de 17,1%, sendo que já foram isoladas duas PLA₂ básicas e cataliticamente inativas homólogas a BnSP-7 o que explicaria o alto IE (AMORIM et. al., 2018)

Os anticorpos anti-BnSP-7 também foram capazes de reconhecer a peçonha de *B. marajoensis* sugerindo que essa peçonha expressa uma quantidade maior de PLA₂s homólogas à BnSP-7 ou que as PLA₂s presentes nesta peçonha possuem uma maior identidade estrutural com a BnSP-7. GRABNER e colaboradores (2017) caracterizaram uma fosfolipase A₂ (BmajPLA₂-II) básica dessa peçonha com potencial antiparasitário, cuja similaridade da sequência parcial de seus aminoácidos é de 90% com a BnSP-7.

As peçonhas de *B. jararaca*, *B. diporus* e *B. brazili* apresentaram valores de IE menores em relação às peçonhas supracitadas e a peçonha de *B. alternatus* não foi reconhecida pelos anticorpos IgY anti-BnSP-7. A peçonha de *B. jararaca* apresenta uma variação do conteúdo de PLA₂, devido a uma variação geográfica promovida pelos diferentes

habitats desses animais nas regiões sudeste e sul do país. Assim os indivíduos que habitam a região sudeste apresentam um conteúdo fosfolipásico de 3,7% o qual é majoritariamente composto por PLA₂ ácidas, enquanto os animais que habitam na região sul apresentam 20,2% de conteúdo de PLA₂, as quais apresentam mais PLA₂s básicas semelhantes a BThTX-I (GONÇALVES-MACHADO et. al., 2016). A peçonha de *B. diporus* apresenta um conteúdo fosfolipásico de 24,1% do total de toxinas, sendo que mais de 15 % representam as enzimas cataliticamente ativas como as PLA₂s Asp49. As isoformas ácidas, sPLA₂-I e sPLA₂-II, representam 3,3% do proteoma total do veneno (GAY et. al., 2016).

A peçonha de *B. brazili* apresentou baixo reconhecimento pelo anticorpo, mesmo ela contendo duas PLA₂s básicas (MTX-II e BbTX-II) cataliticamente inativas bastante semelhantes com a BnSP-7. Há estudos recentes que caracterizaram PLA₂s ácidas nessa peçonha (SOBRINHO, 2014), sendo assim, caso elas estejam em maior quantidade dificultaria o reconhecimento do anticorpo para as Lys49. Estudos proteômicos com as peçonha de *B. alternatus* revelaram que as PLA₂s representam apenas 5 a 7%, sendo a fosfolipase ácida e cataliticamente ativa, Ba SpII RP4, a enzima mais expressa dessa classe nessa peçonha (ÖHLER et. al., 2010; CARDOSO et. al., 2010).

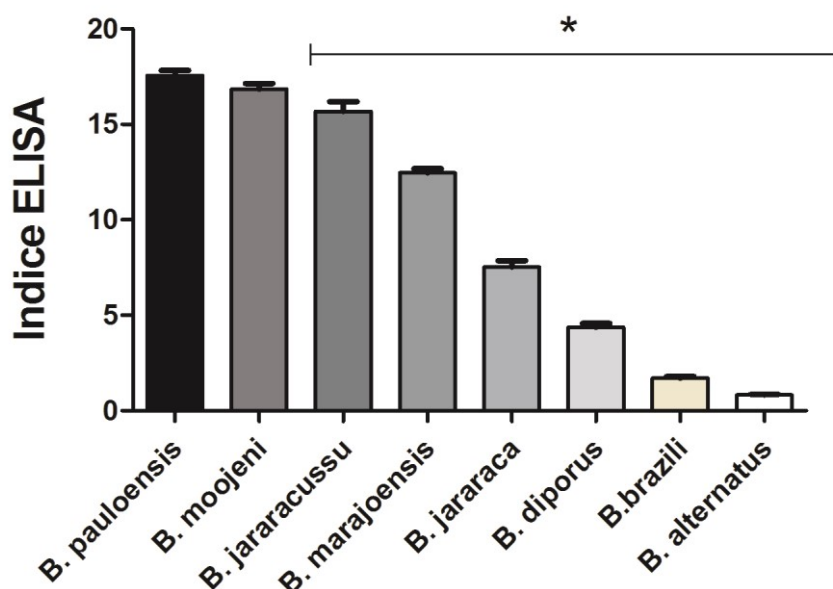


Figura 9: Reatividade cruzada do anticorpo Anti-BnSP-7 (2µg/mL) por ensaio de ELISA contra diferentes peçonhas botrópicas (10µg/mL). Os resultados são apresentados com média e desvio padrão. (IE) índice ELISA. Valores de IE acima de 1.2 foram considerados positivos. * valores significativos $p < 0,05$ em relação ao controle *B. pauloensis*.

Os resultados de reatividade cruzada com as peçonhas brutas demonstraram que as peçonhas de *B. pauloensis*, *B. moojeni* e *B. jararacussu* podem conter PLA₂s Lys49 com maior grau de homologia estrutural com a PLA₂ BnSP-7. Assim, as toxinas isoladas BnSP-7, BnSP-6, BThTX-I, BThTX-II, MjTX-II foram utilizadas nos ensaios de reatividade cruzada (**Fig.10**) e para o alinhamento múltiplo que demonstra as regiões conservadas, a identidade e similaridade das estruturas primárias dessas proteínas (**Fig. 11**), com exceção da BThTX-II.

Os anticorpos IgY anti-BnSP-7 foram efetivos em reconhecer as PLA₂s BnSP-6, BThTX-I e BThTX-II isoladas das peçonhas de *B. pauloensis* e *B. jararacussu*, respectivamente em relação ao controle positivo BnSP-7 (**Fig.10**). A PLA₂MjTX-II de *B. moojeni* apresentou um menor IE.

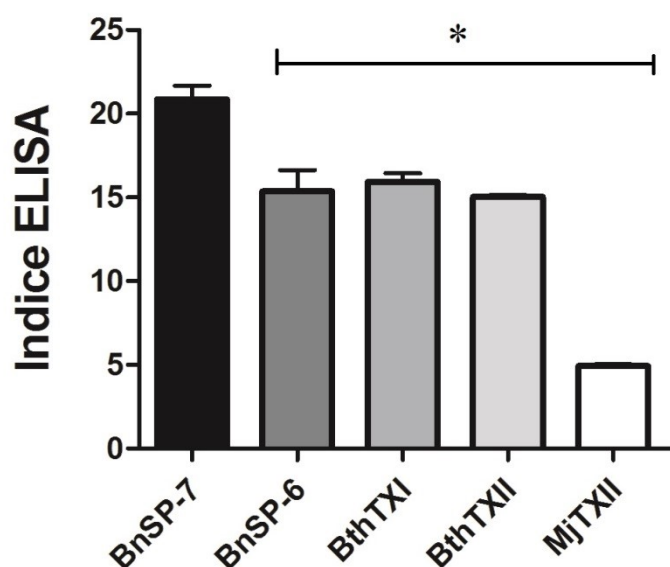


Figura 10: Reatividade cruzada do anticorpo Anti-BnSP-7 (2µg/mL) por ensaio de ELISA contra as PLA₂s (10µg/mL) isoladas BnSP-7, BnSP-6, BThTX-I e BThTX-II e MjTX-II de *B. pauloensis*, *B. jararacussu* e *B. moojeni*, respectivamente. Os resultados são apresentados com média e desvio padrão. (IE) índice ELISA. Valores de IE acima de 1.2 foram considerados positivos. * valores significativos $p < 0,05$ em relação ao controle BnSP-7.

As PLA₂s básicas Lys49 BnSP-6, BThTX-I e MjTX-II apresentaram uma alta identidade e similaridade com a BnSP-7 (**Fig. 11**), corroborando com os dados de reatividade cruzada apresentados na **figura 10**. Entretanto as PLA₂s Asp49 básicas ou ácidas possuem menor grau de identidade e similaridade com a BnSP-7 (**Tabela 3**) e menor reatividade cruzada (**Fig.9**). MELO e colaboradores (2017) descreveram que anticorpos policlonais anti-BnSP-7 produzidos em camundongos apresentaram alta reatividade cruzada com as peçonhas

de *B. pauloensis* e *B. moojeni*, indicando a presença de PLA₂s homólogas a BnSP-7 nestas peçonhas. Contudo, estes mesmos autores demonstraram que as peçonhas da *B. diporus*, *B. jararaca* e *B. alternatus* apresentaram baixo reconhecimento. Estes dados estão de acordo com os nossos resultados, que demonstraram que os anticorpos anti-BnSP-7 são mais eficazes em interagir com PLA₂s Lys49, e dessa forma peçonhas enriquecidas nesta classe de PLA₂s estão mais sujeitas a inibição por este anticorpo.

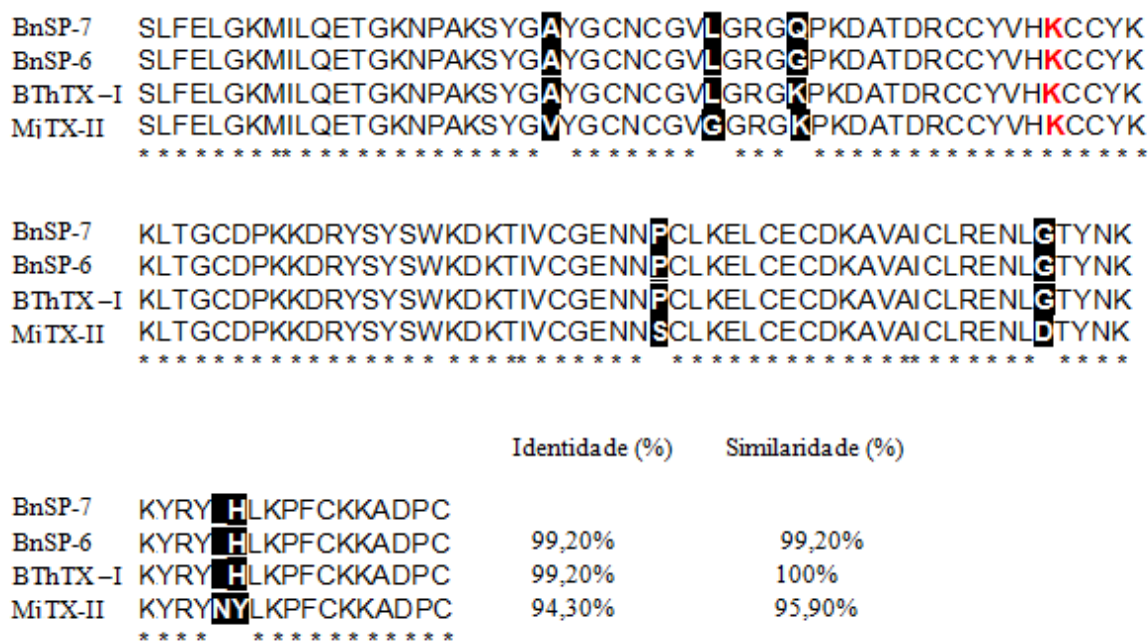


Figura 11: Alinhamento múltiplo Clustal W das PLA₂s Lys49 BnSP-7, BnSP-6, BThTX-I e MjTX-II. A figura apresenta o percentual de identidade e similaridade entre a BnSP-7 e as toxinas BnSP-6, BThTX-I e MjTX-II. As regiões conservadas estão em (*) e o resíduo lisina na posição 49 está destacado em vermelho. Em preto destacam-se resíduos de aminoácidos substituídos nas sequências.

Tabela 3: Porcentagem da identidade e similaridade entre a BnSP-7 e PLA₂s Asp 49 básicas e ácidas.

Espécie	Toxina	Ident(%)	Simil (%)	Referências
PLA₂ Asp49 básicas				
<i>B. jararacussu</i>	BThTX-II	59,80%	72,10%	CORREA et. al., 2008
<i>B. moojeni</i>	BmTX-I	68,30%	76,40%	CALGAROTTO et. al., 2008
PLA₂ Asp49 ácidas				
<i>B. alternatus</i>	BaSpII RP4	44,30%	67,20%	ÖHLER et. al., 2010
<i>B. diporus</i>	sPLA2-I	45,90%	69,70%	QUARTINO et. al., 2012
<i>B. diporus</i>	sPLA2-II	45,10%	70,50%	QUARTINO et. al., 2012
<i>B. jararaca</i>	BJ-PLA2	43,50%	66,10%	SERRANO et. al., 1999

4.3. Mapeamento de epítomos de célula B

Estudos estruturais por cristalografia de raio-X e análises de bioinformática com a PLA₂ BnSP-7 (DE LIMA et. al., 2017) demonstrou que o mecanismo de ação dessa toxina depende de duas regiões principais: (i) o domínio de ancoragem na membrana plasmática (K¹⁶K²⁰K¹¹⁵R¹¹⁸ - MDoS) e (ii) o domínio de desestabilização da membrana (L¹²¹F¹²⁵- MDiS). Os mesmos autores demonstraram que o impedimento do acesso das regiões MDoS e MDiS à membrana, bem como a indução de oligomerização da proteína e o bloqueio da entrada de moléculas no canal hidrofóbico podem levar a perda de atividade biológica dessa proteína (DE LIMA et. al., 2017).

Para analisar as possíveis regiões imunogênicas da proteína BnSP-7 foram utilizadas plataformas *online* que mapearam possíveis epítomos de células B (**Fig. 12**). Pode-se observar que os epítomos selecionados apresentam aminoácidos presentes nos domínios MDoS e MDiS presentes na estrutura da BnSP-7. De acordo com o mecanismo de ação das PLA₂s-Lys49 proposto por FERNANDES et. al., (2013) e CARDOSO et. al., (2018), estas regiões uma vez bloqueadas por diferentes ligantes podem prejudicar a atividade biológica das PLA₂s.

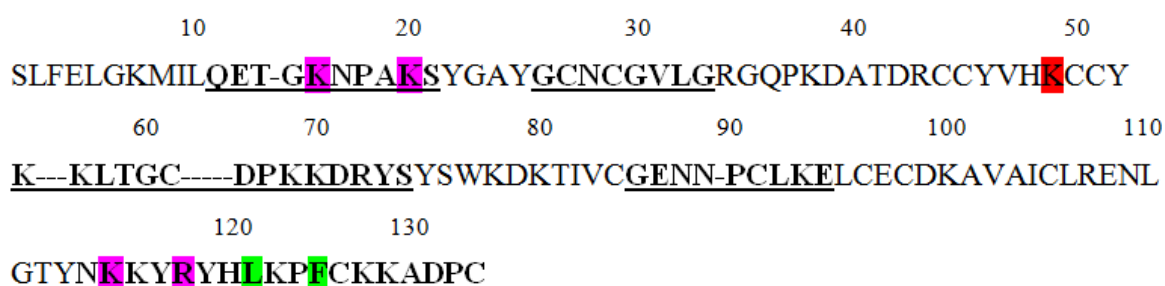


Figura 12: Sequência de resíduos de aminoácidos da PLA₂ Lys49 BnSP-7 demonstrando prováveis epítomos de célula B selecionados (**negrito e sublinhados**). Foram utilizadas plataformas *online* IEDB, Bcepred e Bepipred que mapearam possíveis epítomos de células B. Em vermelho destaca-se o aminoácido Lys na posição 49, em rosa aminoácidos presentes na região MDoS (K¹⁶K²⁰K¹¹⁵R¹¹⁸), em verde aminoácidos presentes na região MDiS (L¹²¹F¹²⁵).

As regiões MDoS (K¹⁶K²⁰K¹¹⁵R¹¹⁸) e MDiS (L¹²¹F¹²⁵) foram identificadas na estrutura terciária da BnSP-7 (**fig. 13**). A **figura 13-A** mostra os epítomos ¹¹QETGKNPAKS²¹, ¹¹⁴NKKYRYHLKPFCKKADPC¹³³ que representam, respectivamente, o final da alfa hélice N-terminal e a “curta” hélice; e o loop C-terminal. Essas regiões em ambos os dímeros interagem para adquirir uma conformação alternativa, sendo o aminoácido Y119 essencial para criar essa “ponte” entre as subunidades da proteína (DOS SANTOS et. al., 2009). Estes

domínios são importantes para a atividade miotóxica das PLA₂s Lys49 e estão acessíveis na superfície da proteína (**fig. 13-B**) (FERNANDES et. al., 2013). Assim os aminoácidos (Leu121Phe125) da região MDiS e (Lys16Lys20Lys115) da região MDoS (**fig. 13-C**) estarão alinhados na estrutura tridimensional do dímero alternativo para interagirem com a membrana e desestabilizá-la levando a morte celular (FERNANDES et. al., 2013).

DE-SIMONE e colaboradores (2013) também identificaram as sequências Q¹¹- K²⁰ e K¹¹⁶- D¹³⁰ como epítomos lineares de célula B para a toxina BThTX-I e calcularam o pI teórico dessas regiões determinando, respectivamente, 9,75 e 8,59. Ambos epítomos apresentam características básicas, sendo que este aspecto da região C-terminal de apresentar muitos aminoácidos com cargas positivas pode exercer influência na ligação de anticorpos nesse local. A região N-terminal por apresentar também esse caráter básico é importante para manter a miotoxicidade de muitas PLA₂ por ser uma região extremamente conservada entre elas.

Demais epítomos identificados na estrutura da BnSP-7 tais como ²⁶GCNCGVLG³³, ⁵³KKLTGCDPKKDRYS⁷⁴ e ⁸⁵GENNPCLKE⁹³ estão localizados na região de ligação do Ca⁺², no final da segunda alfa hélice e no início da terceira alfa hélice, respectivamente (**fig. 13-A**). DE-SIMONE e colaboradores (2013) demonstraram que a região ²⁷CNCG³⁰ apresenta aminoácidos conservados tanto na estrutura das PLA₂s Asp49 quanto em Lys49 que fazem parte do sitio de ligação do cálcio presente em ambas estruturas. A mutação do resíduo tirosina na posição 28 (Y28) nas Asp49 por uma asparagina (N28) é uma das modificações estruturais importantes que confere as Lys49 perda de atividade catalítica (FERNANDES et.al., 2013). Adicionalmente, as sequências ⁵³KKLTGCDPKKDRYS⁷⁴ e ⁸⁵GENNPCLKE⁹³ estão presentes na superfície da BnSP-7 e provavelmente acessível ao anticorpo anti-BnSP 7 (**fig. 13-B**).

PRADO e colaboradores 2016 produziram domínios de ligação de antígeno de cadeia pesada derivada de camelídeos que interagiram com os seguintes aminoácidos da proteína BThTX-I: Arg34, Leu32, Tyr 52, Lys53, Lys 57, Leu 58, Gly60, Pro123, Lys129, Lys127, Cys133; sendo capazes de inibir o efeito miotóxico dessa enzima. A maioria destes resíduos de aminoácidos estão presentes nos epítomos (²⁶GCNCGVLG³³, ⁵³KKLTGCDPKKDRYS⁷⁴, ¹¹⁴NKKYRYHLKPFCKKADPC¹³³) da BnSP-7 (**fig.12**) sugerindo serem bons alvos para o reconhecimento dos anticorpos IgY anti-BnSP-7, como foi demonstrado nos ensaios de reatividade cruzada (**fig. 10**).

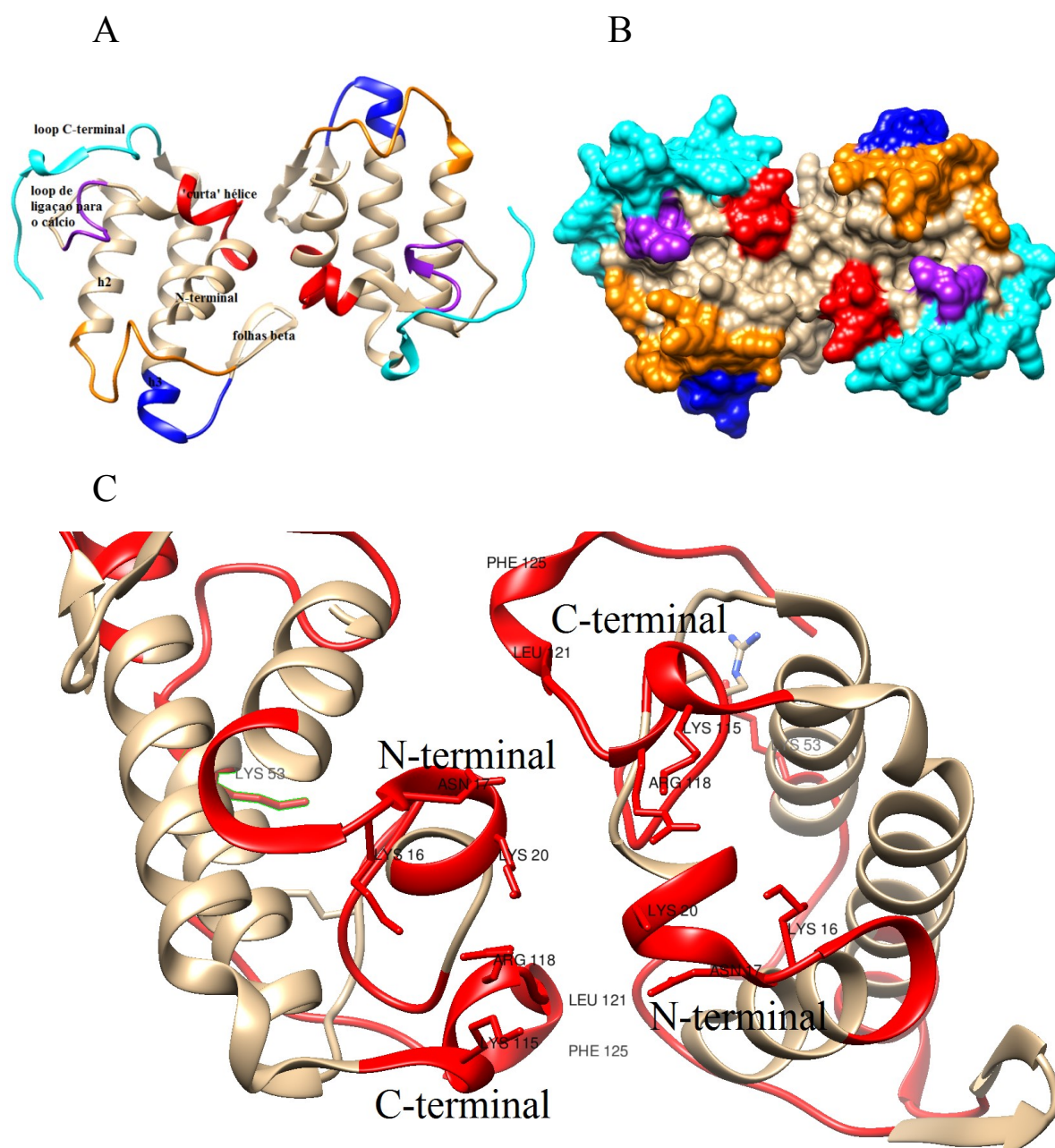


Figura 13: (A) Representação da estrutura tridimensional da BnSP-7 para a localização dos epítomos na estrutura terciária e (B) Representação da superfície da proteína. Os epítomos estão marcados de acordo com as cores: $^{11}\text{QETGKNPAKS}^{21}$ – vermelho; $^{26}\text{GCNCGVLG}^{33}$ – roxo; $^{53}\text{KKLTGCDPKKDRYS}^{74}$ – laranja; $^{85}\text{GENNPCLKE}^{93}$ – azul escuro; e $^{114}\text{NKKYRYHLKPFCKKADPC}^{133}$ – azul claro. (C) Regiões MDiS e MDoS com os seus respectivos aminoácidos, locais de possíveis reconhecimento para neutralização da atividade citotóxica. (Adaptada: PDB – 1PA0 e 5FVJ. UCSF Chimera, Pettersen, 2004).

4.4. Sobreposição de estruturas 3D

O anticorpo IgY anti-BnSP-7 foi capaz de reconhecer outras toxinas PLA₂ básicas além de seu antígeno. Assim, realizou-se a sobreposição das estruturas 3D entre o monômero da BnSP-7 com as toxinas BThTX-I e BThTX-II para se verificar o grau de semelhança tridimensional (**fig. 14 e 15**). O RMSD é o valor médio que define o desvio médio dos átomos usado para classificação e comparação de múltiplas estruturas na busca de proteínas semelhantes, sendo uma métrica de similaridade entre conformações moleculares, sendo que valores altos indicam maiores distâncias entre os átomos e, consequentemente, uma diferença estrutural entre as proteínas ou estruturas que são alvos de comparação (NEVEU et. al., 2018). O TMscore é um parâmetro usado para avaliar a similaridade topológica de duas estruturas protéicas sem levar em consideração o tamanho das proteínas (XU & ZANG, 2010). Esses dois parâmetros foram associados e utilizados no estudo para se analisar a semelhança tridimensional entre a BnSP-7 e as toxinas BThTX-I e BThTX-II.

O valor obtido de RMSD e TMscore para a toxina BThTX-I é igual a 1,09 Å e 0,959, respectivamente, indicando que o enovelamento dessa toxina é semelhante ao da BnSP-7 (**fig.14**), corroborando o alto IE apresentado por essa na **figura 9**. PRADO e colaboradores (2016) usando a toxina BThTX-I como antígeno para a produção de domínios de ligação de antígeno de cadeia pesada derivada de camélídeos, demonstraram que esses apresentaram alta reatividade cruzada com a peçonha de *B. pauloensis*, indicando a presença de PLA₂ homólogas a BThTX-I nessa peçonha. A BThTX-II apesar de ser uma Asp49 apresentou RMSD e TMscore com os respectivos valores 1,56 Å e 0,897 (**fig. 15**), demonstrando que há uma correlação entre as estruturas tridimensionais dessa toxina com a BnSP-7 o que pode ser uma explicação para o reconhecimento do anticorpo (**figura 9**). DOS SANTOS e colaboradores (2011) realizando estudos estruturais, funcionais e de homologia entre as PLA₂, demonstraram que há uma correlação filogenética entre a BThTX-II (entre outras Asp49-PLA₂s miotóxicas) com as Lys49-PLA₂s (dentre elas a BnSP-7) ao formarem um clado monofilético com essas enzimas. FERNANDES e colaboradores (2014) em um estudo de revisão demonstrou que tanto as Asp49 (entre elas a BThTX-II) como as Lys49 apresentam as regiões de MDiS e MDoS, demonstrando que essas regiões de ação miotóxica das toxinas são conservadas nas espécies pertencentes a família Viperidae. Assim pode-se observar que há uma homologia seja pela sequência linear e/ou estrutural entre as PLA₂ dessas peçonhas ao haver uma boa reatividade cruzada entre as peçonhas das espécies de *B. pauloensis* e *B. jararacussu*.

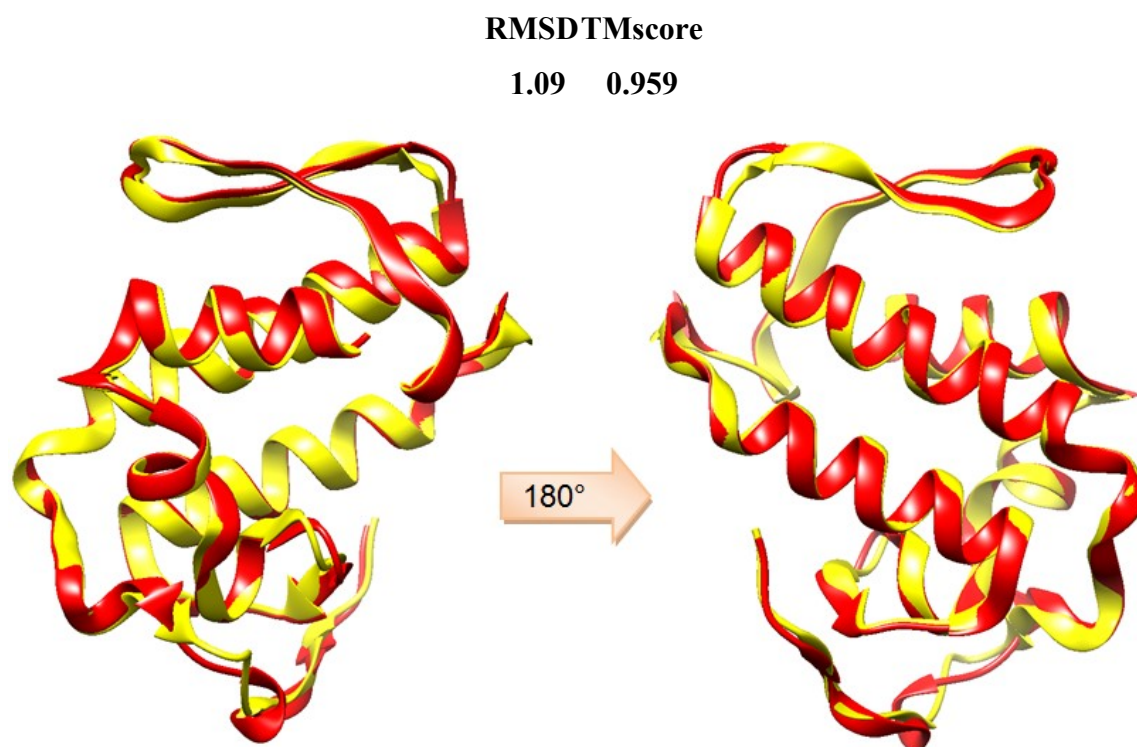


Figura 14: Sobreposição entre a estrutura 3D da BnSP-7 (PDB: 1PA0) e a principal PLA₂s da peçonha de *B. jararacussu*, BThTX-I (PDB: 3HZD) representadas nas cores vermelha e amarela, respectivamente. (UCSF Chimera, Pettersen, 2004).

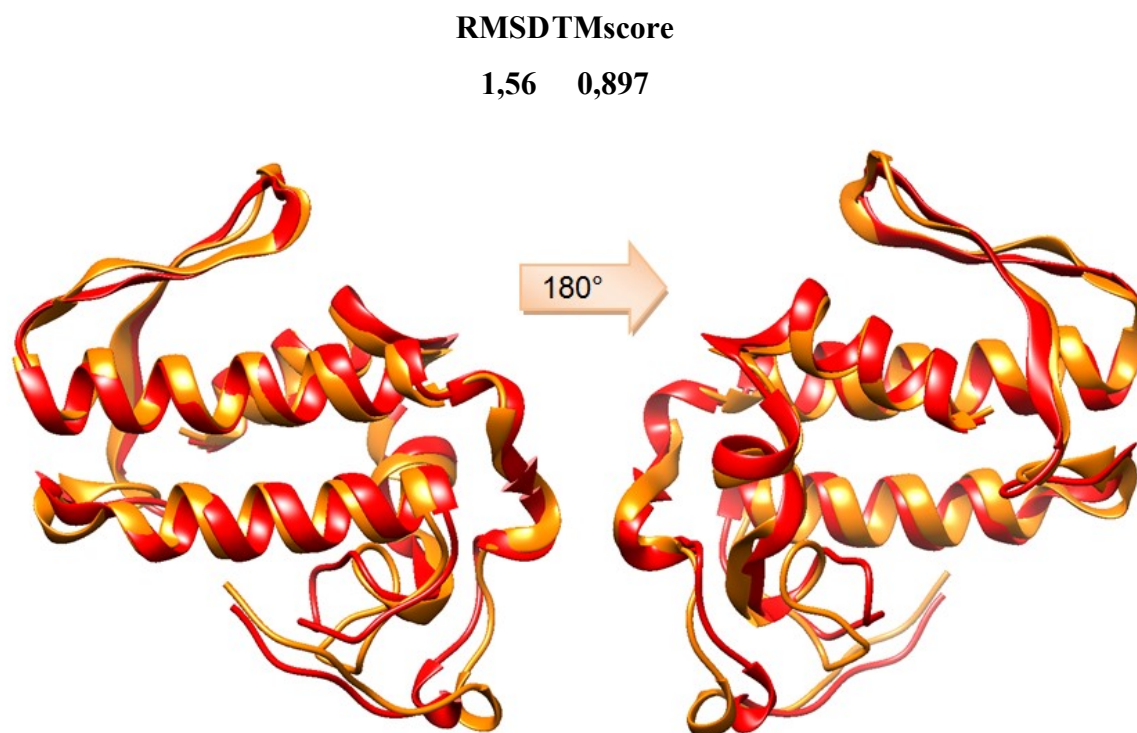


Figura 15: Sobreposição entre a estrutura 3D da BnSP-7 (PDB: 1PA0) e a segunda principal PLA₂s da peçonha de *B. jararacussu*, BThTX-II (PDB: 2OQD) representadas nas cores vermelha e laranja, respectivamente. (UCSF Chimera, Pettersen, 2004).

A principal atividade biológica da BThTX-I é sua capacidade de desestabilizar membranas biológicas, principalmente de músculo esquelético, levando ao quadro de mionecrose. Isso estimulou estudos que buscassem moléculas capazes de neutralizar esses efeitos através de anticorpos. Interessantemente, alguns trabalhos demonstraram a capacidade de anticorpos anti-BThTX-I não só de neutralizar a atividade miotóxica de PLA₂ Lys49 como também de Asp49, demonstrando que há semelhanças estruturais entre essas e, além disso, que a inibição de Asp49 afeta a atividade miotóxica das Lys49 (SOARES et. al., 2004; TAMAROZZI et. al., 2006). MORA-OBANDO e colaboradores (2014) demonstraram que há um sinergismo entre as fosfolipases Asp49 e as Lys49, sendo que a presença de uma quantidade pequena de fosfolipases cataliticamente ativas potencializa a atividade miotóxica das PLA₂-Lys49 ao facilitar o acesso dessas enzimas a substratos hidrofóbicos permitindo que haja uma mudança da conformação dimérica da proteína potencializando sua atividade biológica. BORGES e colaboradores (2018) obtiveram resultados semelhantes quanto ao reconhecimento do anticorpo IgY anti-BnSP-7 para as toxinas derivadas da peçonha de *B. jararacussu*, apresentando IE maior para as Lys49 (BnSP-6, BThTX-I) quando comparada a Asp49 (BThTX-II) e esses mesmos autores demonstraram que o anticorpo foi capaz de neutralizar a atividade miotóxica da BnSP-7.

Portanto estudos que visam à produção de anticorpos anti-PLA₂s capazes de reconhecer e neutralizar ambas Lys49 e Asp49 poderiam trazer vantagens não somente para o tratamento do envenenamento ofídico, mas também para gerar novos conhecimentos acerca da relação estrutura e função dessas proteínas demonstrando o quanto que é importante tanto a sequência linear das proteínas quanto a conformação tridimensional para que o anticorpo seja capaz de reconhecer diferentes toxinas.

5.0 CONCLUSÃO

Neste trabalho foi possível verificar a reatividade cruzada de anticorpos policlonais IgY anti-BnSP-7 com diferentes peçonhas botrópicas. As peçonhas de *B. pauloensis*, *B. moojenie* e *B. jararacussu* foram as mais reativas, apresentando valores maiores de IE. As PLA₂s BnSP-6, BThTX-I, BThTx-II também apresentaram altos valores de IE demonstrando um alto grau de identidade e homologia com a PLA₂ BnSP-7. A predição *in silico* de epítomos de células B identificou diferentes regiões imunogênicas na proteína como MDoS, MDiS e *loop* de ligação do íon Ca²⁺. Além disso, as sobreposições 3D demonstraram que a BnSP-7 apresenta alto grau de homologia estrutural com as PLA₂s da peçonha de *B. jararacussu*. Analisados em conjunto, os resultados de análise de reatividade cruzada, predição de epítomos presentes na BnSP-7 e a sobreposição 3D da estrutura dessa com outras toxinas de diferentes peçonhas ofídicas permitiram identificar a conservação da sequência linear e/ou estrutural nessas proteínas que poderiam ser alvos para estudos de neutralização e também para a síntese de novos compostos farmacologicamente ativos.

6.0 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABBAS, A. K.; LICHTMAN, A. H.; PILLAI, S. H. I. V. *Imunologia celular e molecular*. 7. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2012.

AGUILAR I.; SÁNCHEZ E.E.; GIRÓN M. E.; ESTRELLA A.; GUERRERO B.; RODRIGUEZ-ACOSTA F. A. CORAL SNAKE ANTIVENOM PRODUCED IN CHICKENS (*Gallus domesticus*). **Rev. Inst. Med. Trop.** v. 56, p.61-66, 2014

ALMEIDA C. M. C.; SILVA C. L.; COUTO H. P.; ESCOCARD R. C. M.; ROCHA D. G.; SENTINELLI L. P.; KIPNIS T. L.; SILVA W. D. Development of process to produce polyvalent IgY antibodies anti-African snake venom. **Toxicon**. v.52, p. 293, 2008

ALMEIDA J. R.; MENDES B.; LANCELLOTTI M.; MARANGONI S.; VALE N.; PASSOS Ó.; RAMOS M. J.; FERNANDES P. A.; GOMES P.; DA SILVA S. L. A novel synthetic peptide inspired on Lys49 phospholipase A2 from *Crotalus oreganus abyssus* snake venom active against multidrug-resistant clinical isolates. **European Journal of Medicinal Chemistry**.v.149, p. 248-256, 2018

AMORIM F. G.; COSTA T. R.; BAIWIR D.; DE PAUW E.; QUINTON L.; SAMPAIO S. V. Proteopeptidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of Bothrops moojeni Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. **Toxins**. v. 10, p. 177, 2018

ANGULO Y.; GUTIÉRREZ J. M.; SOARES A. M.; CHO W.; LOMONTE B. Myotoxic and cytolytic activities of dimeric Lys49 phospholipase A2 homologues are reduced, but not abolished, by a pH-induced dissociation. **Toxicon**. v. 46, p. 291–296, 2005

ARNI R. K. e WARD R. J. Phospholipase A2 – A structural review. **Toxicon**. v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

ARNI R. K.; WARD R. J.; GUTIÉRREZ J. M.; TULINSKY A. Structure of a calcium independent phospholipase-like myotoxic protein from Bothrops asper venom. **Acta Crystallogr. D Biol.** v. 51, p. 311–317, 1995

BARREIRA, Patrícia; GOMES, Eva. Doença do soro-like associada à administração de fármacos em idade pediátrica. *Rev. Port. Imunoalergologia*. Lisboa , v. 21, n. 4, p. 267-275, 2013. Disponível em <http://www.scielo.mec.pt/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0871-97212013000400005&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 20 fev. 2019.

BEGHINI, D. G. Isolamento e purificação de uma neurotoxina crotoxina do veneno de *Crotalus durissus cascavella*: caracterização bioquímica e biológica / \ c Daniela Gois Beghini. 2001. 88p. Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual de Campinas, Instituto de Biologia, Campinas, SP. Disponível em: <<http://www.repositorio.unicamp.br/handle/REPOSIP/314672>>.

BERNARDE, P. S.; ALBUQUERQUE, S. D.; TURCI, L. C. B. Serpentes peçonhentas e acidentes ofídicos em Rondônia. São Paulo: **Anolis books**, 1ª ed, 2012.

BORGES I. P.; CASTANHEIRA L. E.; BARBOSA B. F.; SOUZA D. L.; SILVA R. J.; MINEO J. R.; TUDINI K. A.; RODRIGUES R. S.; FERRO E. A.; RODRIGUES V. M. Anti-parasitic effecton *Toxoplasma gondii* induced by BnSP-7, a Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops pauloensis* venom. **Toxicon**. v.119, p 84-91, 2016.

BORGES I. P.; SILVA M. F.; SANTIAGO F. M.; FARIA L. S.; JÚNIOR Á. F.; SILVA R. J.; COSTA M. S.; FREITAS V.; YONEYAMA K. A. G.; FERRO E. A. V.; LOPES D. S.; RODRIGUES R. S.; RODRIGUES V. M. Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* venom. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 112, p 333-342, 2018.

BORGES R. J.; CARDOSO F. F.; FERNANDES C. A. H.; DREYER T. R.; DE MORAES D. S.; FLORIANO R. S.; RODRIGUES-SIMIONI L.; FONTES M. R. M. Functional and structural studies of a Phospholipase A2-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta**. v. 1861, p. 3199-3209, 2017

BORGES, M. H.; RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; KASHIWABUCHI, F. K.; BRANDÃO, V. S.; OLIVEIRA, F. ; IZIDORO, L. F. M.; HOMSIBRANDEBURGO, M. I. Inibição das atividades fosfolipásica A2, miotóxica, edematogênica, hemorrágica e toxicidade presentes nos venenos de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedi pauloensis* e *Apismellifera* pelo extrato vegetal de *Casearia sylvestris* (Flacourtiaceae). In: **III Jornada Paulista de Plantas Medicinais**, p. 107-108, 1997

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

CALGAROTTO A. K.; DAMICO D. C. S.; PONCE-SOTO L. A.; BALDASSO P. A.; DA SILVA S. L.; SOUZA G. H. M. F.; EBERLIN M. N.; MARANGONI S. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**. v.51, p. 1509-1519, 2008

CALVETE J. J.; JUÁREZ P.; SANZ L. Snake venomomics: Strategy and applications. **J Mass Spectrom**. v. 42, n. 11, p. 1405-1414, 2007.

CAMPLESI A. C.; RIVERA G. G.; BONACIN Y. S.; PAULA V. B.; LACERDA NETO J. C.; MOYA-ARAUJO C. F. Associação de plasma sanguíneo ao tratamento de envenenamento botrópico em equino: relato de caso. **Arq. Bras. Med. Vet. Zootec**. v.69, n.4, p.815-820, 2017

CAMPOS, L. DE ALMEIDA. Isolamento e caracterização da delta toxina do veneno de *Crotalus durissus terrificus*. 2006. Dissertação (Mestrado em Tecnologia Nuclear - Aplicações) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006. doi:10.11606/D.85.2006.tde-14052012-135435. Acesso em: 2019-02-13.

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

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, p.605, 2010

CINTRA-FRANCISCHINELLI M.; PIZZO P.; ANGULO Y.; GUTIERREZ J. M.; MONTECUCCO C.; LOMONTE B. The C-terminal region of a Lys49 myotoxin mediates Ca^{2+} influx in C2C12 myotubes. **Toxicon**. v. 55, p. 590-596, 2010

CORRÊA L. C. Estudos estruturais com a BthTX-II, uma Asp49-Fosfolipase A2 miotóxica e com baixa atividade catalítica do veneno de *Bothrops jararacussu* .Dissertação apresentada ao Instituto de Biociências, Campus de Botucatu, UNESP, para obtenção do título de Mestre no Programa de PG em Biologia Geral e Aplicada. 2007

CORRÊA L. C.; MARCHI-SALVADOR D. P.; CINTRA A. C.; SAMPAIO S. V.; SOARES A. M.; FONTES M. R. Crystal structure of a myotoxic Asp49-phospholipase A2 with low catalytic activity: Insights into Ca^{2+} -independent catalytic mechanism. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. v. 1784, p. 591-599, 2008

CUNHA E. M.; MARTINS O. A. Principais compostos químicos presente nos venenos de cobras dos gêneros *Bothrops* e *Crotalus* – uma revisão. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência**, v. 2, n. 02, p. 21-26, 2012.

DA ROCHA D. G.; FERNANDEZ J. H.; DE ALMEIDA C. M. C.; DA SILVA C. L.; MAGNOLI F. C.; DA SILVA O. É.; DA SILVA W. D. Development of IgY antibodies against anti-snake toxins endowed with highly lethal neutralizing activity. **European Journal of Pharmaceutical Sciences**. v. 106, p. 404-412, 2017

DA SILVA, A. M.; BERNARDEP. S.; DEABREUL C. Acidentes com animais peçonhentos no Brasil por sexo e idade. **Rev. bras. crescimento desenvolv. hum.** v.25, n.1, 2015

DE LIMA L. F. G.; BORGES R. J.; VIVIESCAS M. A.; FERNANDES C. A. H.; FONTES M. R. M. Structural studies with BnSP-7 reveal an atypical oligomeric conformation compared to phospholipases A₂-like toxins. **Biochimie**. v. 142, p. 11-21, 2017

DENNIS E.A.; CAO J.; HSU Y.H.; MAGRIOTI V.; KOKOTOS G. Phospholipase A₂ Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. **Chem. Rev.** v.111, p. 6130–6185, 2011

DE-SIMONE S. G.; NAPOLEÃO-PEGO P.; TEIXEIRA-PINTO L. A.; SANTOS J. D.; DE-SIMONE T. S.; MELGAREJO A. R.; AGUIAR A. S.; MARCHI-SALVADOR D. P. Linear B-cell epitopes in BthTX-1, BthTX-II and BthA-1, phospholipase A₂'s from *Bothrops jararacussu* snake venom, recognized by therapeutically neutralizing commercial horse antivenom. **Toxicon**. v. 72, p. 90-101, 2013

DIAS DA SILVA W.; TAMBOURGI D. V. IgY: a promising antibody for use in immunodiagnostic and in immunotherapy. **Vet. Immunol. Immunopathol.** v. 135, p. 173–180, 2010

DOS SANTOS J. I.; SOARES A. M.; FONTES M. R. Comparative structural studies on Lys49-phospholipases A₂ from *Bothrops* genus reveal their myotoxic site. **J.Struct.Biol.** v.167, p. 106-116, 2009

DOS SANTOS J. I.; CINTRA-FRANCISCHINELLI M.; BORGES R. J.; FERNANDES C. A.; PIZZO P.; CINTRA A. C.; BRAZ A. S.; SOARES A. M.; FONTES M. R. Structural, functional, and bioinformatics studies reveal a new snake venom homologue phospholipase A₂ class. **Proteins**. v. 79, p. 61-78, 2011

ERHARD M.; SCHADE R. (2001) Short Introduction to Hens' Humoral Immune System. In: Schade R., Behn I., Erhard M., Hlinak A., Staak C. (eds) *Chicken Egg Yolk Antibodies, Production and Application*. **Springer Lab Manuals**. Springer, Berlin, Heidelberg

FERNANDES C. A.; BORGES R. J.; LOMONTE B.; FONTES M. R. A structure-based proposal for a comprehensive myotoxic mechanism of phospholipase A₂-like proteins from viperid snake venoms. **Biochim Biophys Acta**. v. 1844, n. 12, p. 2265- 2276, 2014.

FERNANDES C. A.; COMPARETTI E. J.; BORGES R. J.; HUANCHAHUIRE-VEGA S.; PONCE-SOTO L. A.; MARANGONI S.; SOARES A. M.; FONTES M. R. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochimica Biophysica Acta (BBA) – Proteins and Proteomics**. v. 1834, p. 2772-2781, 2013

FERNANDES C. A.; MARCHI-SALVADOR D. P.; SALVADOR G. M.; SILVA M. C.; COSTA T. R.; SOARES A. M.; FONTES M. R. Comparison between apo and complexed

structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca²⁺-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. **Journal of Structural Biology**. V.171, p. 31-43. 2010

FUNDAÇÃO EZEQUIEL DIAS. Animais peçonhentos. 2014. Disponível em: <<http://www.funed.mg.gov.br/wp-content/uploads/2010/03/cartilha.pdf>>.

GAY C.; SANZ L.; CALVETE J.J.; PLA D. Snake Venomics and Antivenomics of *Bothrops diporus*, a Medically Important Pitviperin Northeastern Argentina. **Toxins**. v. 8, p. 9, 2016

GONÇALVES-MACHADO L.; PLA D.; SANZ L.; JORGE R.J.B.; LEITÃO-DE-ARAÚJO M.; ALVES M.L.M.; ALVARES D.J.; DE MIRANDA J.; NOWATZKI J.; DE MORAIS-ZANI K.; FERNANDES W.; TANAKA-AZEVEDO A.M.; FERNÁNDEZ J.; ZINGALI R.B.; GUTIÉRREZ J.M.; CORRÊA-NETTO C.; CALVETE J.J. Combined venomics, venom gland transcriptomics, bioactivities, and antivenomics of two *Bothrops jararaca* populations from geographic isolated regions within the Brazilian Atlantic rainforest. **Journal of Proteomics**. v. 135, p. 73–89, 2016

GRABNER A. N.; ALFONSO J.; KAYANO A. M.; MOREIRA-DILL L. S.; DOS SANTOS A.P.A.; CALDEIRA C.A.S.; SOBRINHO J.C.; GÓMEZ A.; GRABNER F.P.; CARDOSO F.F.; ZULIANI J.P.; FONTES M.R.M.; PIMENTA D.C.; GÓMEZ C.V.; TELES C.B.G.; SOARES A.M.; CALDERON L.A. Bm¹PLA2-II, a basic Lys49-phospholipase A2 homologue from *Bothrops marajoensis* snake venom with parasitocidal potential. **International Journal of Biological Macromolecules**. v. 102, p. 571–581, 2017

GUIDOLIN F. R.; TAMBOURGI D. V.; GUIDOLIN R.; MARCELINO J. R.; OKAMOTO C. K.; MAGNOLI F. C.; QUEIROZ G.P.; DA SILVA W.D. Characterization of anti-crotalic antibodies. **Toxicon**. v. 66, p. 7–17, 2013

GUTIÉRREZ J. M.; WARRELL D. A.; WILLIAMS D. J.; JENSEN S.; BROWN N.; CALVETE J. J.; HARRISON R.A. The need for full integration of snakebite envenoming within a global strategy to combat the neglected tropical diseases. **PLoS One**. v.7, p. 2162, 2013

ISBISTER G. K.; O'LEARY M. A.; HAGAN J.; NICHOLS K.; JACOBY T.; DAVERN K.; HODGSON W. C.; SCHNEIDER J. J. Cross-neutralisation of Australian brown snake, taipan and death adder venoms by monovalent antibodies. **Vaccine**. v. 28, p. 798-802, 2010

JUNIOR A. F.; SANTIAGO F. M.; SILVA M. V.; FERREIRA F. B.; MACEDO JUNIOR A. G.; SANTIAGO F. M.; SILVA M. V.; FERREIRA F. B.; MACEDO JUNIOR A. G.; MOTA C. M.; FARIA M. S.; SILVA FILHO H. H.; SILVA D. A.; CUHA-JUNIOR J. P.; MINEO J. R.; MINEO T.W. Production, Characterization and Applications for *Toxoplasma gondii*-Specific Polyclonal Chicken Egg Yolk Immunoglobulins. **PLoS ONE**. v. 7, p.40391, 2012.

KARLSSON M.; KOLLBERG H.; LARSSON A. Chicken IgY: utilizing the evolutionary advantage. **World's Poultry Science Journal**. v.60, p.341-348, 2004.

KASHIMA S.; ROBERTO P. G.; SOARES A. M.; ASTOLFI-FILHO S.; PEREIRA J. O.; GIULIATI S.; FARIA M. J. R.; XAVIER M. A.; FONTES M. R.; GIGLIO J. R.; FRANÇA S. C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects1: I—gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. **Biochimie**. v. 86, p. 211–219 , 2004

KINI R. M.; EVANS H. J. A common cytolytic region in myotoxins, hemolysins, cardiotoxins, and antibacterial peptides. **Int. J. PeptProt Res**. v. 34, p. 86-277, 1989

KINI, R. M. Phospholipase A2 – A complex multifunctional protein puzzle. In: Kini, R.M. Venon Phospholipase A2 Enzymes. John Wiley & Sons England, Cap. 1, p. 1-28, 1997.

KOHLHOFF M.; BORGES M.H.; YARLEQUE A.; CABEZAS C.; RICHARDSON M.; SANCHEZ E.F. Exploring the proteomes of the venoms of the Peruvian pit vipers *Bothrops atrox*, *B. barnetti* and *B. pictus*. **Journal of Proteomics**. v. 75, p. 2181-2195, 2012

LIMA, Lino Fernando Gomes de. Caracterização bioquímica e funcional da rBnSP-7: uma fosfolipase A2 homóloga recombinante de *Bothrops pauloensis*. 2013. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2013

LOMONTE B.; ANGULO Y.; MORENO E. Synthetic Peptides Derived from the C-Terminal Region of Lys49 Phospholipase A2 Homologues from Viperidae Snake Venoms: Biomimetic Activities and Potential Applications. **Current pharmaceutical design** .v. 16, p. 3224-3230, 2010

LOMONTE B.; MORENO E.; TARKOWSKI A.; HANSON L. Å.; MACCARANA M. Neutralizing interaction between heparins and myotoxin II, a Lys49 phospholipase A2 from *Bothrops asper* snake venom. Identification of a heparin-binding and cytolytic toxin region by the use of synthetic peptides and molecular modeling. **J Biol Chem**. v.269, p. 29867-29873, 1994.

MAGRO A. J.; SOARES A. M.; GIGLIO J. R.; FONTES M. R. M. Crystal structures of BnSP-7 and BnSP-6, two Lys49-phospholipases A2: quaternary structure and inhibition mechanism insights. **Biochem.Biophys. Res. Commun**. v. 311, p. 713– 720, 2003

MELANI R. D.; ARAUJOG D. T.; CARVALHO P. C.; GOTO L.; NOGUEIRA F. C. S.; JUNQUEIRA M.; DOMONT G. B. Seeing beyond the tip of the iceberg: A deep analysis of the venome of the Brazilian Rattlesnake, *Crotalus durissus terrificus*. **EuPA Open Proteomics**. v. 8, p. 144-156, 2015

MELO L. L.; MENDES M. M.; ALVES L. M.; ISABEL T. F.; VIEIRA S. A. P. B.; GIMENES S. N. C.; SOARES A. M.; RODRIGUES V. M.; IZIDORO L. F. M. Cross-reactivity and inhibition myotoxic effects induced by Bothrops snake venoms using specific polyclonal anti-BnSP7 antibodies . **Biologicals** .v. 50,p. 109-116, 2017

MINISTERIO DA SAUDE. 2018. **Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>

MINISTERIO DA SAUDE. 2018. **Acidentes por animais peçonhentos: o que fazer e como evitar**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>>

MINISTERIO DA SAUDE. 2018. **Brasil copatrocinou resolução para o problema dos acidentes ofídicos no mundo**. Disponível em: <<http://portalms.saude.gov.br/noticias/svs/43413-brasil-copatrocinou-resolucao-para-o-problema-dos-acidentes-ofidicos-no-mundo>>

MORA-OBANDO D.; FERNÁNDEZ J.; MONTECUCCO C.; GUTIÉRREZ J. M.; LOMONTE B. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A2 Myotoxins of Viperid Snake Venom In Vitro and In Vivo. **PLOS ONE**. v. 9, p.109846, 2014

MURAKAMI M. T.; VIÇOTI M. M.; ABREGO J. R. B.; LOURENZONI M. R.; CINTRA A. C. O.; ARRUDA E. Z.; TOMAZ M. A.; MELO P. A.; ARNI R. K. Interfacial surface charge and free accessibility to the PLA2-active site-like region are essential requirements for the activity of Lys49 PLA2 homologues. **Toxicon**. v. 49, p. 378-387, 2007

MURPHY K.; TRAVERS P.; WALPORT M.; AND JANEWAY C. (2008). **Janeway's immunobiology**. (New York: Garland Science).

NAGAO-DIAS A. T.; BARROS-NUNES P.; COELHO H. L. L.; SOLÉ D. Reações alérgicas a medicamentos. **Jornal de Pediatria**. v.80, p. 259-266, 2004

NEVEU E.; POPOV P.; A. HOFFMANN, A. MIGLIOSI, X. BESSERON, G. DANOY, P. BOUVRY, S. GRUDININ. Rapid RMSD: determinação rápida de RMSDs correspondentes a movimentos de moléculas flexíveis, *Bioinformática* , volume 34, edição 16, 15 de agosto de 2018, páginas 2757-2765, <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/bty160>

NUNES, D. C.; FIGUEIRA M. M.; LOPES D. S.; DE SOUZA D. L.; IZIDORO L. F.; FERRO E. A.; SOUZA M. A.; RODRIGUES R. S.; RODRIGUES V. M.; YONEYAMA K. A. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A2 from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**. v. 140, p. 844-854, 2013.

ÖHLER M.; GEORGIEVA D.; SEIFERT J.; VON B. M.; ARNI R.K.; GENOV N.; BETZEL C. The venomics of *Bothrops alternatus* is a pool of acidic proteins with predominant hemorrhagic and coagulopathic activities. **Journal of Proteome Research**. v. 9,p. 2422–2437, 2010

OLIVEIRA C. F.; LOPES D. S.; MENDES M. M.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; HAMAGUCHI A.; ALCÂNTARA T. M.; CLISSA P. B.; RODRIGUES V. M. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. **Toxicon**. v. 53, p. 560-569, 2009

PETERS B.; SIDNEY J.; BOURNE P.; BUI H-H.; BUUS S.; DOH G.; et al. The Immune Epitope Database and Analysis Resource: From Vision to Blueprint. **PLoS Biol**. v. 3, p. 91, 2005

PETTERSEN E. F.; GODDARD T. D.; HUANG C. C.; COUCH G. S.; GREENBLATT D. M.; MENG E. C.; FERRIN T. E. UCSF Chimera--a visualization system for exploratory research and analysis. **J. ComputChem**. v. 25; p. 1605-1612, 2004.

PONCE-SOTO L. A.; MARTINS-DE-SOUZA D.; MARANGONI S. Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the new basic PLA₂ isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II isolated from the *Bothrops marajoensis* (Marajó Lancehead) snake venom. **The Protein Journal**. v. 29, p. 103–113, 2010

PRADO N. D. R; PEREIRA S. S.; DA SILVA M. P.; MORAIS M. S. S.; KAYANO A. M.; MOREIRA-DILL L. S.; et al. Inhibition of the Myotoxicity Induced by *Bothrops jararacussu* Venom and Isolated Phospholipases A₂ by Specific Camelid Single-Domain Antibody Fragments. **PLoS ONE**. v.11, 2016

QUARTINO P.J.Y.;GERARDO J.L.B.; FIDELIO D.Cloning and functional expression of secreted phospholipases A₂ from *Bothrops diporus* (YararáChica). **Biochemical and Biophysical**.v.427, p. 321-325, 2012

RODRIGUES V. M.; SOARES A. M.; MANCIN A. C.; FONTES M. R.; HOMSI-BRANDEBURGO M. I.; GIGLIO J. R. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedii* snake venoms: biochemical characterization and biological activity. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol**. v.121, p. 215-22, 1998

SALVADOR G. H.; CAVALCANTE W. L.; DOS SANTOS J. I.; GALLACCI M.; SOARES A. M.; FONTES M. R. Structural and functional studies with myotoxin II from *Bothrops moojeni* reveal remarkable similarities and differences compared to other catalytically inactive phospholipases A₂-like. **Toxicon**. v. 72, p. 52-63, 2013

SALVADOR G. H. M. Estudos estruturais de complexos entre fosfolipases a2 homólogos isoladas do veneno de *Bothrops moojeni* e inibidores da atividade miotóxica. 2016. 121p.

Tese (doutorado) – Universidade Estadual Paulista, Instituto de Biociências, Câmpus de Botucatu, SP. Disponível em: <<https://repositorio.unesp.br/handle/11449/138270>>

SALVADOR, G. H.; DOS SANTOS, J. I.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. Crystal structure of a phospholipase A2 from *Bothrops asper* venom: Insights into a new putative "myotoxic cluster". **Biochimie**. v. 133, p. 95-102, 2017

SANTOS-FILHO N. A.; LORENZON E. N.; RAMOS M. A.; SANTOS C. T.; PICCOLI J. P.; BAUAB T. M.; FUSCO-ALMEIDA A. M.; CILLI E. M. Synthesis and characterization of an antibacterial and non-toxic dimeric peptide derived from the C-terminal region of Bothropstoxin-I. **Toxicon** . v. 103, 2015, p. 160-168, 2015

SCHADE R.; CALZADO E. G.; SARMIENTO R.; CHACANA P. A.; PORANKIEWICZ-ASPLUND J.; TERZOLO H. R. Chicken egg yolk antibodies (IgY-technology): a review of progress in production and use in research and human and veterinary medicine. **ATLA**. v. 33, p. 1–26, 2005

SCHALOSKE R. H.; DENNIS E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. **Biochimica e Biophysica Acta**, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

SEGURA Á.; HERRERA M.; VILLALTA M.; VARGAS M.; GUTIÉRREZ J. M.; LEÓN G. Assessment of snake antivenom purity by comparing physicochemical and immunological methods. **Biologicals**. v. 41, p. 93–97, 2013

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

SHENG Y. J.; NI H. J.; ZHANG H. Y.; LI Y. H.; WEN K.; WANG Z. H. Production of chicken yolk IgY to sulfamethazine: comparison with rabbit antiserum IgG. **Food and Agricultural Immunology**. n. 3, v. 26, p. 305–316, 2015

SOARES A. M.; ANDRIÃO-ESCARSO S. H.; ÂNGULO Y.; LOMONTE B.; GUTIÉRREZ J. M.; MARANGONI S.; TOYAMA M. H.; ARNI R. K.; GIGLIO J. R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A₂ homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch Biochem Biophys**. v. 373, n. 1, p. 7-15, 2000.

SOARES A. M.; SESTITO W. P.; MARCUSSI S.; STÁBELI R. G.; ANDRIÃO-ESCARSO S. H.; CUNHA O. A. B.; GIGLIO J. R. Alkylation of myotoxic phospholipases A2 in *Bothrops moojeni* venom: a promising approach to an enhanced antivenom production. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**. v. 36, p. 258–270, 2004

SOBRINHO, Juliana Conceição. Isolamento e caracterização bioquímica e estrutural de fosfolipases a2 ácidas do veneno da serpente *Bothrops brazili*. 2014. 80 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental, Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2014.

SOUSA L. F.; NICOLAU C. A.; PEIXOTO P. S.; BERNARDONI J. L.; OLIVEIRA S. S.; PORTES-JUNIOR J. A.; MOURÃO R. H.; LIMA-DOS-SANTOS I.; SANO-MARTINS I. S.; CHALKIDIS H. M.; VALENTE R. H.; MOURA-DA-SILVA A. M. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 7, p. 2442, 2013

TAMAROZZI M. B.; SOARES S. G.; MARCUSSI S.; GIGLIO J. R.; BARBOSA J. E. Expression of recombinant human antibody fragments capable of inhibiting the phospholipase and myotoxic activities of *Bothrops jararacussu* venom. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**. v. 1760, p. 1450–1457, 2006

TASOULIS, T. E ISBISTER, G. K. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxicon**. v. 9, 2017.

TEIMOORI S.; ARIMATSU Y.; LAHA T.; KAEWKES S.; SEREERAK P.; SRIPA M.; TANGKAWATTANA S.; BRINDLEY P.J.; SRIPA B. Chicken IgY-based coproantigen capture ELISA for diagnosis of human opisthorchiasis. **Parasitology International**. v.66, p.443–447, 2016.

TEIXEIRA C. F.; LANDUCCI E. C.; ANTUNES E.; CHACUR M.; CURY Y. Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipases A2. **Toxicon**. v. 42, n. 8, p.947-962, 2003.

WHO, 2010. Guidelines for the Production, Control and Regulation of Snake AntivenomImmunoglobulins. WHO Press, Geneva (141 pp.).

XU J.; ZHANG Y. “How significant is a protein structure similarity with TM-score = 0.5?” **Bioinformatics**. vol. 26, p. 889-895, 2010

XU Y.; LI X.; JIN L.; ZHEN Y.; LU Y.; LI S.; YOU J.; WANG L. Application of chicken egg yolk immunoglobulins in the control of terrestrial and aquatic animal diseases: a review. **Biotechnology Advances**. v.29, n.6, p.860-868, 2011.