



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”
INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS DE BOTUCATU
BACHARELADO EM FÍSICA MÉDICA**

CÍNTIA FERNANDA ALVES

**ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOFÍSICOS DE UMA FOSFOLIPASE A₂ NÃO
CATALÍTICA ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops matogrossensis***

BOTUCATU

2019



CÍNTIA FERNANDA ALVES

**ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOFÍSICOS DE UMA FOSFOLIPASE A₂ NÃO
CATALÍTICA ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops matogrossensis***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Estadual Paulista 'Júlio de
Mesquita Filho' como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do Grau de
Bacharel em Física Médica, sob a orientação
do Professor Dr. Marcos Roberto de Mattos
Fontes e coorientação do Dr. Guilherme
Henrique Marchi Salvador

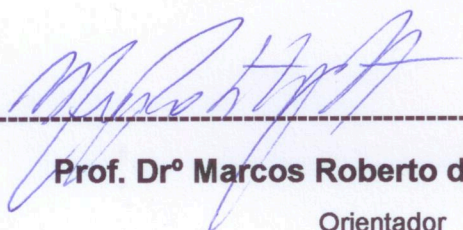
BOTUCATU

2019

CÍNTIA FERNANDA ALVES

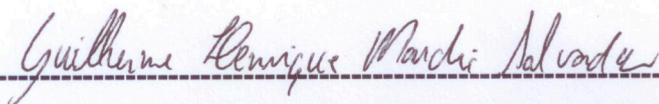
**ESTUDOS FUNCIONAIS E BIOFÍSICOS DE UMA FOSFOLIPASE A₂ NÃO
CATALÍTICA ISOLADA DO VENENO DA SERPENTE *Bothrops matogrossensis***

Trabalho de Conclusão de Curso submetido à
Universidade Estadual Paulista 'Júlio de
Mesquita Filho' como parte dos requisitos
necessários para a obtenção do Grau de
Bacharel em Física Médica, sob a orientação
do Professor Dr. Marcos Roberto de Mattos
Fontes e coorientação do Dr. Guilherme
Henrique Marchi Salvador



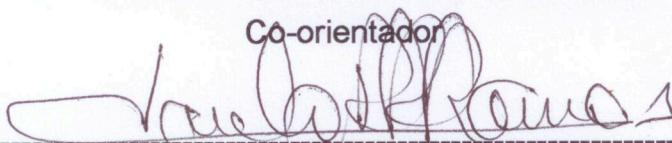
Prof. Drº Marcos Roberto de Mattos Fontes

Orientador



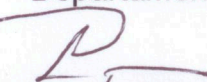
Drº Guilherme Henrique Marchi Salvador

Co-orientador



Prof. Drº Paulo Roberto Rodrigues Ramos

Departamento de Física e Biofísica



Prof. Drº Roberto Morato Fernandez

Departamento de Física e Biofísica

Botucatu, 07 de Novembro de 2019

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO TÉC. AQUIS. TRATAMENTO DA INFORM.
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CÂMPUS DE BOTUCATU - UNESP

BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE-CRB 8/5651

Alves, Cíntia Fernanda.

Estudos funcionais e biofísicos de uma fosfolipase A2 não catalítica isolada do veneno da serpente *Bothrops Matogrossensis* / Cíntia Fernanda Alves. - Botucatu, 2019

Trabalho de conclusão de curso (bacharelado - Física Médica)
- Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho",
Instituto de Biociências de Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Guilherme Henrique Marchi Salvador

Capes: 20901003

1. *Bothrops*. 2. Jararaca (Cobra). 3. Cobra venenosa - Veneno. 4. Necrose. 5. Cromatografia líquida. 6. Fosfolipases.

Palavras-chave: Caracterização; Cromatografia; Mionecrose; Peçonha; Toxina.

Dedico este trabalho aos meus pais Maria Sinete e Claudemir, à minha irmã Maria Cecília e aos demais que diretamente ou indiretamente contribuíram para o sucesso da minha graduação.

AGRADECIMENTOS

Primeiramente agradeço a Deus que me deu saúde e forças para superar os momentos difíceis que me deparei ao longo da graduação, permitindo a realização de um sonho.

Sou grata à minha família, em especial a minha mãe Maria Sinete dos Santos Alves, meu pai Claudemir Alves e minha irmã Maria Cecília Alves, que com muito carinho sempre me ensinaram e incentivaram a lutar pelos meus objetivos e não mediram esforços para que esse sonho fosse realizado.

Aos meus grandes amigos cultivados ao longo da vida pelo companheirismo nos momentos bons e ruins tornando essa caminhada mais feliz.

Ao meu amigo e companheiro Adonis A. L. de Paula e sua família pelo imenso carinho que tiveram comigo ao longo desses anos.

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” - UNESP/Botucatu, pela oportunidade de realização do curso de física médica.

A todos os professores do curso pela dedicação em transmitir conhecimento.

Ao meu orientador Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes e coorientador Guilherme H. M. Salvador pela excelente orientação profissional, apoio e confiança durante os anos de pesquisa. E a todos os colegas do Laboratório de Biologia Molecular e estrutural pela colaboração quando necessário.

Agradeço ao incentivo da política de permanência estudantil que proporcionou todo suporte necessário garantindo minha permanência na universidade. Bem como a CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro.

A todos que direta e indiretamente contribuíram para minha formação, o meu muito obrigado!

RESUMO

ALVES, Cíntia Fernanda. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Física Médica). 2019. – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019.

A maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem na América Latina são causados por serpentes do gênero *Bothrops*. Aproximadamente 90% do peso seco do veneno de serpentes é constituído por diferentes proteínas, como Fosfolipases A₂ (PLA₂s), por exemplo. PLA₂s-like são proteínas homólogas que mantem grande semelhança estrutural com as PLA₂s, porém ausentes de atividade enzimática. Estas proteínas participam diretamente no estabelecimento da mionecrose em acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops*. Portanto, o objetivo deste trabalho foi realizar ensaios funcionais, bioquímicos e biofísicos de uma proteína PLA₂s-like presente no veneno da serpente *Bothrops matogrossensis*. Os procedimentos de purificação da toxina foram conduzidos à temperatura ambiente a partir do veneno bruto em duas etapas de cromatografia líquida, sendo elas filtração em gel e fase reversa. Para se observar o grau de pureza da amostra, foram feitos experimentos de gel de eletroforese SDS-PAGE 13% em todas as etapas. Após a obtenção da toxina purificada, foram realizados experimentos de Espalhamento de Luz Dinâmico (DLS), espectrometria de massas, atividade de fosfolipase A₂ em substrato e atividade miotóxica *In Vivo*. Os resultados obtidos pelos experimentos mostram a proteína PLA₂s-like denominada BmatTX purificada na conformação dimérica, ausência de atividade catalítica e com atividade miotóxica. Além disso, os dados iniciais de espectrometria de massas mostrou que BmatTX corresponde a toxina BmatTX-I isolada da serpente de *B. matogrossensis* já caracterizada e descrita na literatura.

Palavras-chave: peçonha; mionecrose; toxina; cromatografia; caracterização.

ABSTRACT

ALVES, Cíntia Fernanda. Trabalho de Conclusão de Curso (Bacharel em Física Médica). 2019. – Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Botucatu, 2019

Most of snakebite accidents that occur in Latin America are caused by *Bothrops* snakes. Approximately 90% of the venom are consisted by different proteins, such as Phospholipases A₂ (PLA₂s). PLA₂s-like are homologous proteins with high homology and structural similarity to PLA₂s, but lacking of enzymatic activity. These proteins are directly involved in the establishment of myonecrosis in accidents involving *Bothrops* snakes. Here, we present the functional, biochemical and biophysical experiments involving a PLA₂-like isolated from the *Bothrops mattogrossensis* snake venom. The toxin was purified at room temperature using liquid chromatography by two purification steps: gel filtration and reverse phase chromatography. To observe the purity of the sample, SDS-PAGE 13% experiments were performed in all steps of purification. The purified samples was submitted to Dynamic Light Scattering (DLS) experiments, mass spectrometry, substrate phospholipase A₂ activity and *in vivo* myotoxic activity. The results obtained by the experiments show the purification of a PLA₂s-like protein called BmatTX. BmatTX toxin has a dimeric conformation, absence of catalytic activity and potent myotoxic activity. Then, the initial data of Mass spectrometric data showed that BmatTX corresponds to BmatTX-I from *B. mattogrossensis* snake, already characterized and described in the literature.

Keywords: venom; myonecrosis; toxin; chromatography; description.

1 INTRODUÇÃO

A organização Mundial da Saúde (OMS) estima que por ano, ocorrem cerca de 2,7 milhões de acidentes por picada de serpentes peçonhentas, ocorrendo aproximadamente entre 81 mil a 138 mil mortes e outros 400 mil podem resultar em sequelas e incapacitações (OPAS/OMS, 2018). Os acidentes ofídicos acometem majoritariamente moradores de comunidades rurais de países subdesenvolvidos, como África, Ásia e América Latina (OMS, 2007).

Gutiérrez (2013) publicou um artigo que alertava a negligência da comunidade global e da indústria farmacêutica em relação a acidentes ofídicos, sendo que apenas em 2017, a Organização Mundial da Saúde (OMS) adicionou os acidentes ofídicos como uma Doença Tropical Negligenciada (DTN's).

Segundo dados da Secretaria de Vigilância em Saúde e do Ministério da Saúde (SVS/MS, 2019), no Brasil anualmente ocorrem aproximadamente 29 mil acidentes envolvendo serpentes peçonhentas, ocorrendo em média 125 óbitos. Em geral, os episódios ocorrem devido a acidentes de trabalho no campo em que os membros inferiores e superiores dos trabalhadores estão desprotegidos, sendo os mais atingidos. Além do mais, desequilíbrios ecológicos que conduzem comportamentos fora dos padrões dos animais aumentam o número de ocorrências de acidentes. Devido sua gravidade e impacto econômico, os acidentes ofídicos são considerados um sério problema de saúde pública (LEMOS, 2009).

As espécies de serpentes de maior importância médica no Brasil pertencem às famílias *Viperidae* (*Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) e *Elapidae* (*Micrurus*), onde devido ao grande número de espécies e distribuição pelo país, ocorrem acidentes em todos os estados brasileiros e em diferentes ambientes (WARRELL, 2019). Entre esses principais, destacam-se as serpentes do gênero *Bothrops*, conhecida popularmente como Jararaca e/ou Jararacuçu, que são responsáveis por aproximadamente 75% dos acidentes no território brasileiro, devido à ampla distribuição nas regiões do país (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, 2019; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2009). Dentre as importantes serpentes do gênero *Bothrops*, podemos destacar a *Bothrops matogrossensis*, que pode ser encontrada em diferentes países da América do Sul, como Paraguai, Bolívia, Peru e Brasil (SILVA; RODRIGUES, 2008; AMARAL, 1925).

A peçonha de serpentes do gênero *Bothrops* possui importante efeito patológico local nos tecidos humanos, o qual ocorre após a inoculação do veneno nas vítimas. Dentre eles, podemos observar ação proteolítica (lesões locais e destruição tecidual levando a edema e necrose); ação coagulante (através de uma cascata de eventos causa alterações na coagulação sanguínea); ação hemorrágica (provoca lesões na membrana basal dos vasos sanguíneos), sendo que o quadro clínico se agrava ao longo do tempo, até acometido receber atendimento médico (PINHO; PEREIRA, 2001; OTERO, 2002).

Venenos de serpentes são compostos por uma mistura de diferentes moléculas que apresentam diversas propriedades biológicas. Aproximadamente 90% do peso seco é constituído por diferentes proteínas, como por exemplo, proteases, L-aminoácido oxidases e fosfolipases A₂ (PLA₂- E.C. 3.1.1.4). PLA₂s são enzimas cálcio dependentes que podem participar de diversos processos fisiológicos, como o remodelamento de membranas, mediação de processos inflamatórios e digestão de fosfolipídios. Estas enzimas podem ser encontradas de forma abundante em venenos de artrópodes e répteis, participando diretamente no estabelecimento da mionecrose em acidentes envolvendo serpentes do gênero *Bothrops* (LOMONTE; ÂNGULO; CALDERON, 2003).

Outra proteína com potente atividade miotóxica presente em venenos de serpentes são as PLA₂s-like, que mantem grande semelhança estrutural em relação às PLA₂s, porém ausentes de ação enzimática. Estas PLA₂s-like possuem a mutação do aminoácido ácido aspártico (Asp) para uma lisina (Lys) na posição 49 (Asp49Lys). As Lys49-PLA₂s são cataliticamente inativas devido à incapacidade da ligação do íon Ca⁺² (essencial para atividade enzimática), pois o sítio de ligação está ocupado pela cadeia lateral do aminoácido lisina. Apesar de serem cataliticamente inativas, as Lys49-PLA₂s ainda são capazes de lesar membranas diretamente por meios independentes de cálcio (ARAGÃO, 2005; FERNANDES *et al.*, 2014; CHACUR, 2004).

O tratamento mais eficaz contra os acidentes ofídicos é a soroterapia, aplicando-se o soro antiofídico específico para cada gênero de serpente. Porém, os efeitos locais produzidos pela peçonha não são facilmente neutralizados pelo tratamento convencional, acarretando em danos teciduais graves (LOMONTE *et al.*, 2009; GUTIÉRREZ, 2006). Neste trabalho, foram realizados experimentos de

purificação, caracterização biofísica e bioquímica de uma Lys49-PLA₂-like presente no veneno da serpente *Bothrops matogrossensis*, chamada de BmatTX, a fim de avaliar e obter importantes informações sobre sua ação miotóxica.

2 MATERIAL E MÉTODOS

2.1 Purificação da toxina a partir do veneno bruto

O veneno bruto liofilizado da serpente *Bothrops Matogrossensis* foi cedido gentilmente pela Dr^a. Paula H. Santa Rita do Biotério da Universidade Católica Dom Bosco, Campo Grande - MS.

Experimentos de purificação da BmatTX a partir do veneno bruto de *B. matogrossensis*, foram realizados utilizando a técnica de cromatografia líquida de alta pressão (HPLC) em equipamentos *ÄKTA Purifier (GE Healthcare)* e uma coluna de filtração em gel (*Superdex 75 10/300*) em temperatura ambiente. Cerca de 10 mg de veneno bruto liofilizado foram diluídos em tampão formato de amônio (50 mM, pH 3,5), centrifugado por 10 minutos a 10.000 rpm a 4 °C e aplicado na coluna previamente equilibrada e eluída com o mesmo tampão.

A fração correspondente à BmatTX foi coletada e liofilizada. Visando a retirada de possíveis contaminantes, foi realizada uma segunda etapa de purificação por cromatografia de fase reversa em coluna *Shim-pack C-18 CLS-ODS (Shimadzu)*, em que a amostra foi diluída em 0,1% de ácido trifluoroacético (TFA) e submetida ao gradiente de 0% - 66% Acetonitrila (diluído em 0,1% de TFA). A fração correspondente à BmatTX foi liofilizada para a utilização em outros experimentos.

2.2 Eletroforese

Em todas as etapas de purificação da BmatTX, as frações obtidas foram submetidas a experimentos de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13%, seguindo o protocolo de Laemmli (1970). As amostras foram preparadas adicionando tampão de corrida desnaturante (Tris HCl pH 6,8; Sodium Dodecyl Sulfate (SDS); Glicerol; β - mercaptoetanol; azul de bromofenol). Após a aplicação das amostras no gel SDS-PAGE a corrida ocorreu a 75V/ 35mA e por fim o gel foi corado com azul de coomassie.

2.3 Espectrometria de massas

A análise por espectrometria de massas da BmatTX foi feita em colaboração com a Dra. Lucilene Delazari dos Santos (Centro de Venenos e Animais Peçonhentos - CEVAP), Dr. Celso Luís Marino e Dr. Bruno César Rossini (Instituto de Biotecnologia da UNESP- IBTEC).

A proteína BmatTX em solução e a amostra retirada do gel de eletroforese foram quantificadas pelo método de Bradford (1976) e digeridas utilizando tripsina (Thermo). Os peptídeos obtidos foram submetidos em coluna de dessalinização *Peptide Cleanup C-18 (Agilent Technologies)*.

Após a separação dos peptídeos, foram realizadas análises do tipo *label free* em equipamento de nanocromatografia líquida *Ultimate 3000 LC (Dionex, Germering, Germany)* acoplado à um equipamento de espectrometria de massa *Q-Exactive (Thermo Fisher Scientific, Bremen, Germany)*. Os dados de espectrometria de massa foram adquiridos por meio do software *Thermo Xcalibur (versão 4.0.27.19, Thermo-Fisher Scientific Inc.)* e os dados brutos obtidos foram analisados submetendo-os ao software *PatternLab (versão 4.0.0.84 [CARVALHO et al, 2016])* para identificação das proteínas.

2.4 Espalhamento de Luz Dinâmico

A amostra de BmatTX concentrada a 5 mg.mL^{-1} em tampão bicarbonato de amônio, 50 mM, pH 8,0 foi utilizada em experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS) em equipamento *DynaPro TITAN (Wyatt Technology)* a 18 °C. Foram coletadas 100 aquisições e os dados foram analisados utilizando o software *DYNAMICS V.6.10 (Wyatt Technology)*.

2.5 Atividade de Fosfolipase A₂ em substrato

Os experimentos de atividade catalítica foram realizados utilizando-se o *kit sPLA₂ Assay (Cayman Chemical Company)*. O produto da catálise do substrato na porção *sn-2* gera uma molécula de ácido graxo livre e uma molécula de ácido 5-*thio-2Nitrobenzoico* onde sua absorbância pode ser medida no comprimento de onda de 414 nm. Foram aplicadas cinco amostras diferentes, sendo elas o controle positivo (PLA₂ isolada do veneno de abelha - Bee-PLA₂ - 10 µg), o controle negativo

(PLA₂-like isolada do veneno de *Bothrops moojeni* – MjTX-II – 10 µg), veneno bruto de *B. mattogrossensis* (10 µg) e a BmatTX (10 e 50 µg). Foram realizadas seis leituras no espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* (*Thermo Scientific*) para cada amostra a 414 nm com intervalos de 1 min, gerando-se um gráfico da absorbância x tempo.

2.6 Atividade miotóxica *In vivo*

Foram utilizados 3 grupos experimentais contendo 5 camundongos Swiss (16-18 g) machos, fornecido pelo Biotério Central da UNESP. Até serem utilizados, os animais permaneceram em gaiolas em ambiente com temperatura controlada (22 ± 2 °C) recebendo água e alimento *ad libitum*. Os experimentos realizados com os animais foram aprovados pelo Comitê de Ética (processo 033/05).

Para o grupo controle, foram injetados 100 µL de solução salina (PBS) no músculo gastrocnêmio, 100 µL de toxina na concentração de 50 µg diluído em PBS e 100 µL de veneno bruto na concentração de 50 µg diluído em PBS. A atividade miotóxica foi analisada medindo a atividade da creatina quinase no plasma. Após 3 h das injeções, foram colhidas amostras de sangue após secção da extremidade da cauda dos camundongos em tubos heparinizados e centrifugados para a separação do plasma. Ao fim dos experimentos, camundongos foram sacrificados na câmara de gás. Foi utilizado o *kit CK-NAC UV AA* (*Wiener Lab*) para a determinação do nível da creatina quinase liberada após a lesão muscular, seguindo o protocolo do fabricante. As leituras de cada amostra foram feitas no espectrofotômetro *NanoDrop 2000c* (*Thermo Scientific*) a 340 nm, por 4 minutos a 37° C. A atividade foi expressa em unidades por litro (U/L), onde uma unidade corresponde à produção da fosforilação de um nanomol de creatina por minuto.

3 RESULTADOS E DISCUSSÕES

3.1 Purificação da toxina BmatTX por cromatografia líquida e experimentos de espalhamento de luz dinâmico

As frações obtidas no processo de purificação utilizando coluna de gel filtração *Superdex 75 10/300* foram eluídas em tampão de 50 mM de formato de amônio pH 3,5 e detectadas a 280 nm. As frações obtidas no processo de

purificação (Figura 1) foram submetidas a um experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida a 13% (Figura 1 – inserto), podendo ser possível observar uma proteína com massa molecular de aproximadamente 14 kDa, correspondente a toxina de interesse.

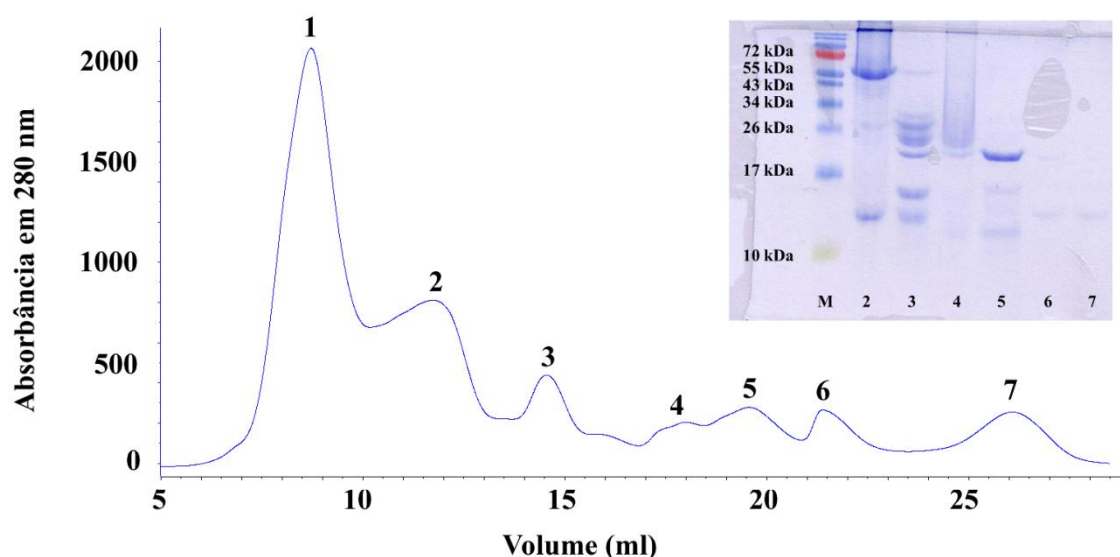


Figura 1: Gráfico obtido a partir da cromatografia de filtração em gel utilizando o veneno bruto de *B. mattogrossensis*, onde os picos obtidos estão numerados de 1 até 7. A fração de número 3 corresponde a toxina alvo desse estudo. O inserto da figura mostra um gel de eletroforese de poliacrilamida a 13% com amostras em forma reduzida (1-7) e M corresponde ao marcador de massa molecular.

A fração de número 3 foi liofilizada e submetida a uma segunda etapa de purificação em coluna de fase reversa *Shim-pack C-18 CLS-ODS* (Shimadzu) e gradiente de 0% - 66% de Acetonitrila (diluído em 0,1% de TFA).

O cromatograma da figura 2 mostra a presença de nove picos, sendo o pico seis correspondente a BmatTX. A fim de se verificar o grau de pureza das amostras obtidas, estas foram submetidas a um experimento de gel em poliacrilamida a 13% (Figura 2 – inserto), onde se observou a presença da toxina no pico de número 6.

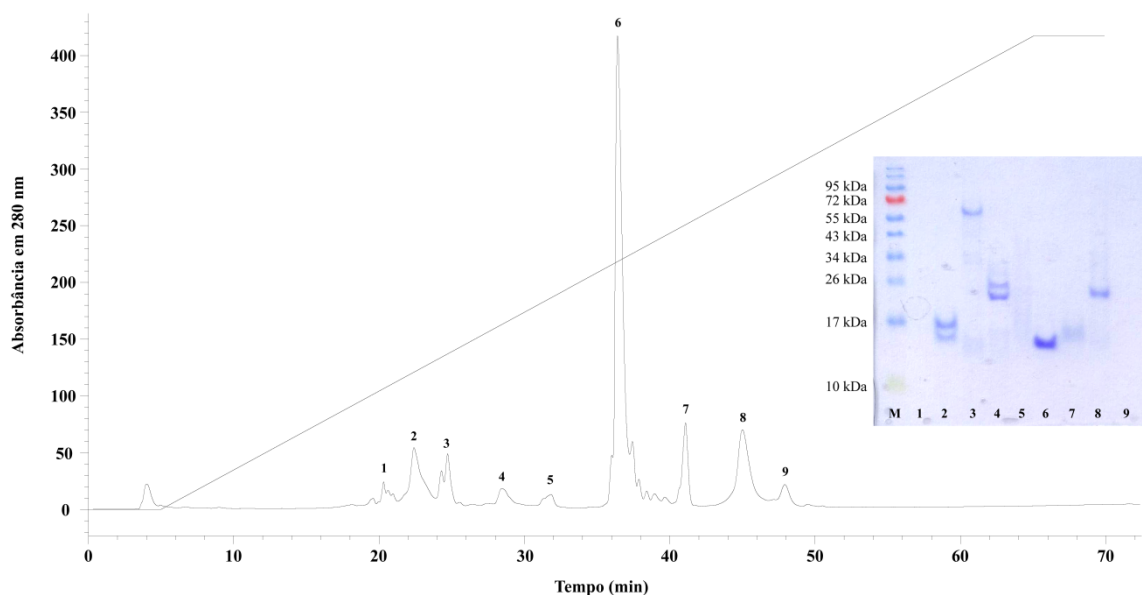


Figura 2: Cromatografia de fase reversa em coluna C-18 ODS (Shimadzu). Foram obtidos 9 picos a partir de um gradiente de 0-66% de acetonitrila (em 0,1% de TFA), sendo o de número 6, correspondente a PLA₂-like. O inserto da figura mostra um gel de eletroforese em poliacrilamida a 13% com as frações, onde a fração de número 6 corresponde a massa de aproximadamente 14 kDa.

Em seguida, a amostra foi concentrada e submetida a experimentos de espalhamento de luz dinâmico (DLS). Os dados obtidos mostraram uma amostra monodispersa (Polidispersidade de 4,6%), com raio hidrodinâmico de 2,6 nm e massa molecular estimada de 30 kDa, estimando ser uma proteína dimérica assim como outras Lys49-PLA₂s descritas na literatura (FERNANDES et al., 2010; SALVADOR et al., 2015).

3.2 Espectrometria de massas

A análise dos dados obtidos por Espectrometria de massas realizada pelo software Pattern Lab utilizando como parâmetro o banco de dados *UniProt* (taxonomia *Bothrops*) mostraram uma cobertura de 27% e *protein score* de 27,25 quando comparado com a BmatTX-I (P0DMJ9) depositada no banco de dados.

A sobreposição e alinhamento entre os dois peptídeos obtidos por espectrometria de massas da toxina BmatTX e a proteína BmatTX-I (código P0DMJ9) revelou que a toxina isolada possui uma lisina na posição 49 (Figura 3), além de um peptídeo também estar presente na porção N-terminal da toxina.

Protein ID: P0DMJ9 Coverage: 18 / 51 = 0.353

001 SLVELGKMIL QETGKNPVT YGAYGCNCGV LGHGKPKDAT DRCCYVHKCC Y

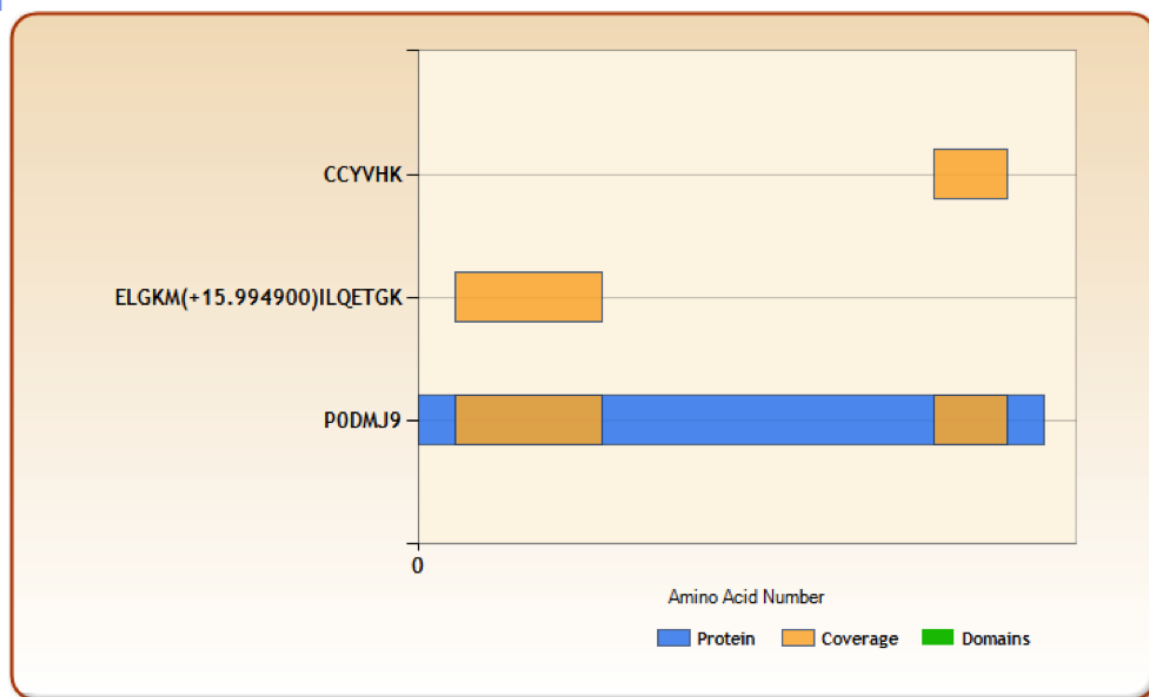


Figura 3: Sobreposição e alinhamento dos dados de sequenciamento obtidos neste trabalho com a proteína P0DMJ9 (BmatTX-I). É possível notar que os resíduos são mais abundantes na porção N-terminal da toxina.

Os dados obtidos por espectrometria de massas revelam que a toxina isolada em nossos estudos, corresponde a BmatTX-I, que é uma toxina isolada da serpente *Bothrops matogrossensis*, a qual é uma toxina com potente atividade miotóxica e que também não possui atividade enzimática (DE MOURA *et al.*, 2014).

3.3 Atividade de Fosfolipase A₂

Os experimentos para a atividade catalítica das amostras isoladas e do veneno bruto de *B. matogrossensis* foram conduzidos utilizando o kit sPLA₂ Assay (Cayman Chemical Company). A atividade catalítica foi monitorada pela absorbância do produto da catálise em 414 nm (Figura 3).

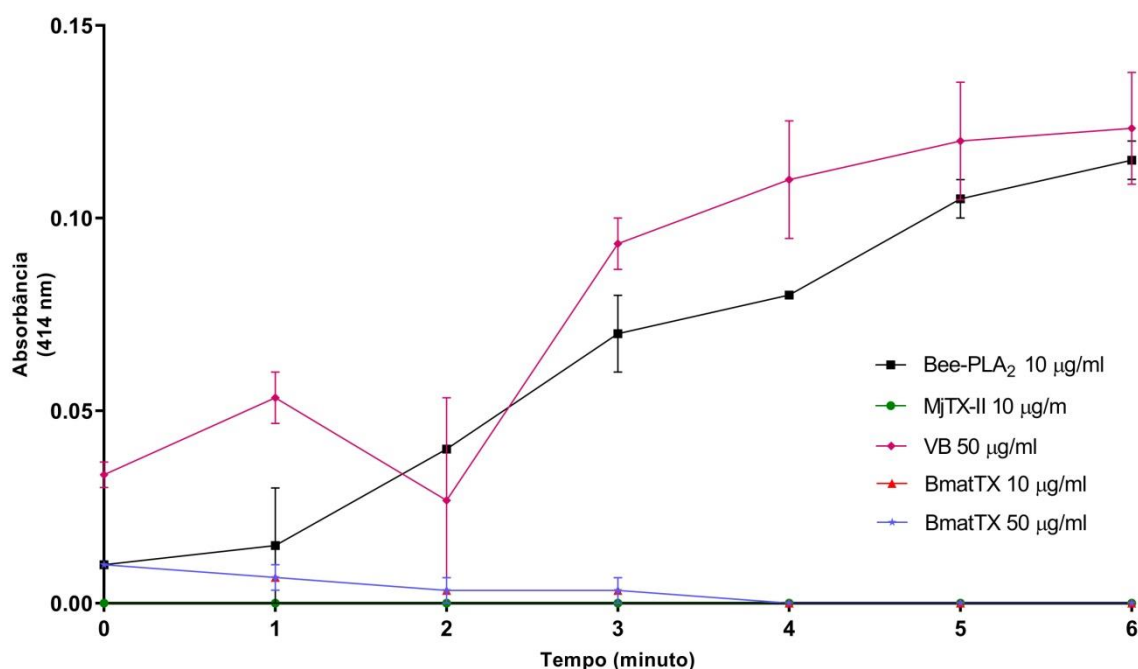


Figura 4: Gráfico da atividade enzimática utilizando as amostras de uma fosfolipase A_2 do veneno de abelha 10 µg/mL (quadrado preto - controle positivo), PLA₂-like do veneno de *B. moojeni* 10 µg/mL (círculo verde – controle negativo), veneno bruto 10 µg/mL (losango magenta), BmatTX 10 µg/mL (triângulo vermelho) e BmatTX 50 µg/mL (estrela azul) em substrato fornecido pelo quite sPLA₂ Assay (Cayman Chemical Company).

Os resultados dos experimentos mostram que o controle positivo (Bee-PLA₂) e o veneno bruto de *B. matogrossensis* possuem atividade catalítica, diferentemente da amostra de MjTX-II e da amostra purificada de BmatTX, que em diferentes concentrações, não apresentaram liberação do produto da catálise por meio de atividade enzimática (absorbância em 414 nm).

3.4 Atividade miotóxica

Para o grupo controle foi possível obter um n=4, sendo que uma amostra coagulou no capilar; para o grupo da toxina obteve-se um n=3, sendo que as outras duas amostras coagularam no capilar; para o grupo do veneno bruto não se obteve nenhuma amostra para a análise, pois a amostra foi letal aos camundongos na concentração testada.

As leituras da absorbância no espectrofotômetro a 340 nm, em 4 minutos foram plotadas gerando um gráfico com as médias referente a atividade de creatina quinase (CK) (figura 5).

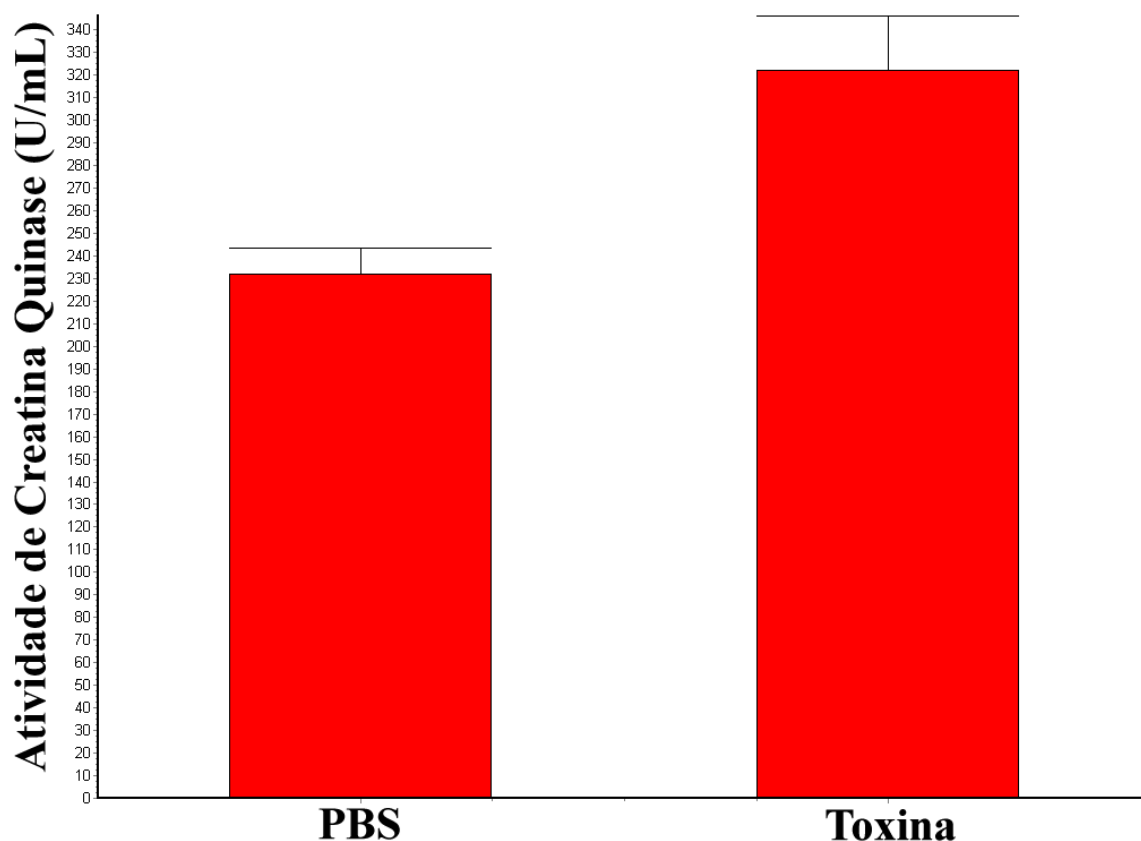


Figura 5: Atividade da Creatina Quinase analisada para o grupo controle (PBS) e grupo com injeção da toxina BmatTX.

A CK é uma enzima intramuscular, sendo assim, após ocorrer a lesão muscular, há um aumento na quantidade dessa proteína no sangue. A comparação da atividade da CK para os grupos PBS (controle) e Toxina mostra que o dano tecidual (toxicidade) causado pela proteína isolada foi significativa, como mostrado na figura 5. A absorbância lida pelo grupo controle é referente à lesão causada durante a injeção intramuscular da solução salina no animal, já a toxina provocou lesões mais severas devido suas propriedades.

Testes realizados por De Moura (2014) mostram que o veneno bruto de *B. matogrossensis* quando inoculado induz atividade coagulante, proteolítica e hemorrágica, isso explica o fato de os camundongos injetados com veneno bruto terem morrido após a aplicação da amostra.

Como descrito anteriormente na literatura, a atividade miotóxica das toxinas Lys49-PLA₂s está relacionada diretamente com a sua estrutura quaternária (DOS SANTOS *et al.*, 2009; FERNANDES *et al.*, 2010; SALVADOR *et al.*, 2013; SALVADOR *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2017; SALVADOR *et al.*, 2019). Os sítios

descritos e relacionados à atividade miotóxica dessas toxinas são compostos por duas porções, sendo um deles o sítio catiônico responsável pela ancoragem/ligação à membrana celular (*Membrane Docking Site* – MDoS) e o outro sítio composto por resíduos hidrofóbicos responsável pela ruptura da membrana (*Membrane Disruption Site* – MDiS). A conformação dimérica dessas toxinas auxilia na formação dos sítios funcionais, sendo o MDoS composto pelos aminoácidos Lys16, Lys20, Lys115 e Arg118 presentes em cada monômero (Figura 6a). Além disso, os resíduos que compõem o MDiS (Leu122 e Phe125) também ficam alinhados quando a toxina está na forma dimérica (Figura 6b) (FERNANDES *et al.*, 2013; FERNANDES *et al.*, 2014; SALVADOR *et al.*, 2015; BORGES *et al.*, 2017).

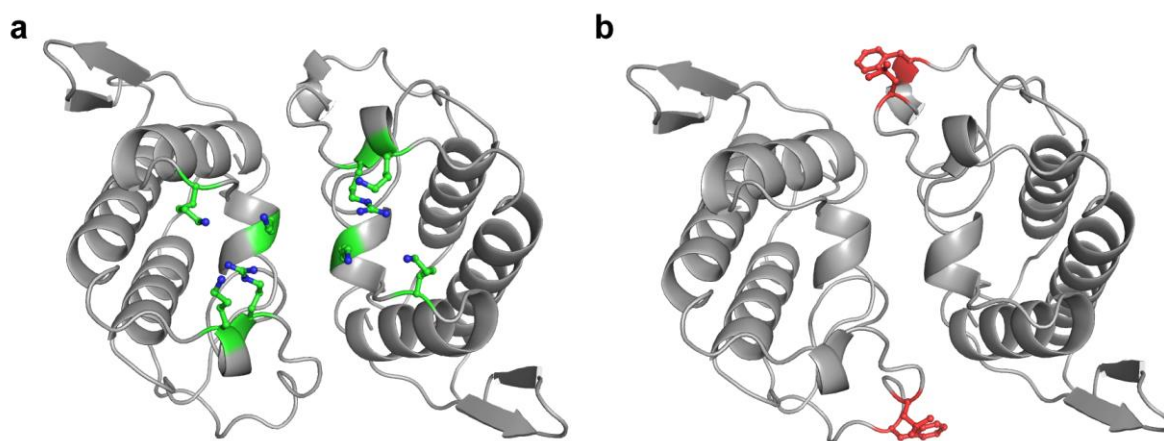


Figura 6: Estrutura da toxina MjTX-II e em destaque os sítios funcionais das PLA₂s-like. **a)** Aminoácidos que correspondem ao sítio catiônico de ancoragem à membrana (MDoS) apresentados na forma de sticks (verde). **b)** Aminoácidos correspondentes ao sítio de ruptura da membrana (MDiS) apresentados na forma de sticks (vermelho) (SALVADOR *et al.*, 2015).

Os resultados dos experimentos de DLS com a BmatTX revelaram que a toxina também apresenta conformação dimérica, a qual pode estar relacionada diretamente com a atividade miotóxica observada para a BmatTX desse trabalho.

4 CONCLUSÃO

Com os experimentos realizados nesse trabalho, foi possível caracterizar por meio de estudos funcionais, bioquímicos e biofísicos a toxina BmatTX, isolada da serpente de *Bothrops Mattogrossensis*, correspondente a uma PLA₂s-like. Os dados dos estudos biofísicos e funcionais mostraram que a toxina BmatTX apresenta conformação dimérica, atividade catalítica ausente devido a presença do

aminoácido lisina na posição 49 e potente ação miotóxica. Desta forma o estudo da toxina BmatTX revelou que a mesma corresponde a toxina BmatTX-I já descrita e caracterizada na literatura. Portanto, os resultados aqui descritos podem ser utilizados para posterior elucidação estrutural a fim de buscar compreender os mecanismos de ação dessa toxina.

5 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AMARAL, A. A general consideration of snake poisoning and observations on Neotropical pit-vipers. Contributions from the Harvard Institute for Tropical Biology and Medicine. **Harvard university press**, v. 2, p. 1-64, 1925. Disponível em: <https://ia600301.us.archive.org/10/items/generalconsider00Amar/generalconsider00Amar_bw.pdf>. Acesso em: 12 ago. 2019.

ARAGÃO, E.A. **Efeito Bactericida de Fosfolipases A₂-Lys49**: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais. 2005. Dissertação (Mestrado)- Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2005. Doi: 10.11606/D.59.2005.tde-08072008-112329.

BORGES, R. J. et al. Functional and structural studies of a Phospholipase A₂-like protein complexed to zinc ions: Insights on its myotoxicity and inhibition mechanism. **Biochim Biophys Acta**, v. 1861, ed. 1, p. 3199-3209, jan. 2017. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2016.08.003>.

BRADFORD, M.M. Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding. **Analytical Biochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. DOI: [http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697\(76\)90527-3](http://dx.doi.org/10.1016/0003-2697(76)90527-3).

CARVALHO P. C. et al. PatternLab for proteomics 4.0: A one-stop shop for analyzing shotgun proteomic data. **Nature protocols**, 11(1):102-117, Jan. 2016. DOI: <https://doi.org/10.1038/nprot.2015.133>

CHACUR, M. **Efeito Nociceptivo Induzido por Fosfolipases A₂ (variantes Lys49 e Asp49) isoladas do veneno de serpentes *Bothrops asper***: caracterização dos mecanismos centrais e determinantes moleculares. Tese (Doutorado em Ciências) - Universidade de São Paulo, São Paulo, 2004. DOI: 10.11606/T.42.2004.tde-20012006-143532.

DE MOURA, A.A et al. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops mattogrossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and Tumor Cells. *BioMed Res. Int.*, v. 2014, p. 1-13, mar. 2014. DOI: <http://dx.doi.org/10.1155/2014/195356>.

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, n.2, p.106-16, Aug. 2009.

FERNANDES, C. A. et al. 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, 30 Sept. 2014.

FERNANDES, C. A. et al. Structural bases for a complete myotoxic mechanism: crystal structures of two non-catalytic phospholipases A₂-like from *Bothrops brazili* venom. **Biochim Biophys Acta**, v. 1834, n. 12, p. 2772-81, Dec. 2013.

FERNANDES, C.A. et al. 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. **J Struct Biol**, v. 171, n.1, p. 31-43, jul. 2010.

GUTIÉRREZ J.M; THEAKSTON R.D.G; WARRELL D.A. Confronting the Neglected Problem of Snake Bite Envenoming: The Need for a Global Partnership. **PLoS Med**, v. 3, n. 6, p. e150, 2006. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pmed.0030150>.

GUTIÉRREZ, J.M. et al. (2013) The Need for Full Integration of Snakebite Envenoming within a Global Strategy to Combat the Neglected Tropical Diseases: The Way Forward. **PLoS Negl Trop Dis** 7(6): e2162. DOI: <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0002162>

Laemmli, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.

LEMOS, Josiverton de Carvalho et al. Epidemiologia dos acidentes ofídicos notificados pelo Centro de Assistência e Informação Toxicológica de Campina Grande (Ceatox-CG), Paraíba. **Rev. bras. epidemiol.**, São Paulo, vol.12, n.1, p.50-59, mar. 2009. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S1415-790X2009000100006>.

LOMONTE, B. et al. Neutralization of *Bothrops asper* venom by antibodies, natural products and synthetic drugs: Contributions to understanding snakebite envenomings and their treatment. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 1012-1028, Dec 1 2009.

LOMONTE, B.; ÂNGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A₂ myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 885-901, Dec 15 2003.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Guia de Vigilância Epidemiológica. **Série A. Normas e Manuais Técnicos**, Brasília-DF, ed. 7, 2009. Disponível em: http://bvsms.saude.gov.br/bvs/publicacoes/guia_vigilancia_epidemiologica_7ed.pdf >. Acesso em: 12 ago. 2019.

ORGANIZAÇÃO PAN-AMERICANA DE SAÚDE; ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE. Assembleia Mundial da Saúde termina com aprovação de resoluções sobre diversos temas. **OPAS/OMS Brasil**, 28 maio 2018. Disponível em: <https://www.paho.org/bra/index.php?option=com_content&view=article&id=5684:as-sembleia-mundial-da-saude-termina-com-aprovacao-de-resolucoes-sobre-diversos-temas&Itemid=875>. Acesso em: 11 ago. 2019.

OTERO, R. et al. Complications of *Bothrops*, *Porthidium*, and *Bothriechis* snakebites in Colombia. A clinical and epidemiological study of 39 cases attended in a university hospital. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1107-1114, Aug. 2002.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista Assoc. Med. Bras.**, v. 47, n 1, jan./mar., 2001. DOI: <http://dx.doi.org/10.1590/S0104-42302001000100026>.

SALVADOR, G. H. et al. Search for eficiente inhibitors of myotoxic activity induced by ophidian phospholipase A2-like proteins using functional, structural and bioinformatics approaches. **Nature**, v. 9, n. 510, 2019. DOI: <https://doi.org/10.1038/s41598-018-36839-6>.

SALVADOR, G. H. **Estudos estruturais de complexos entre fosfolipases A₂ homólogas isoladas do veneno de *Bothrops moojeni* e inibidores da atividade miotóxica**. Tese de Doutorado- Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho” Instituto de Biociências, Botucatu, 2016.

SALVADOR, G. H. et al. Structural and functional evidence for membrane docking and disruption sites on phospholipase A₂-like proteins revealed by complexation with the inhibitor suramin. **Acta. Cryst.**, v. D71, p. 2066-2078, 2015. DOI: <https://doi.org/10.1107/S1399004715014443>.

SALVADOR, G. H. et al. Structural and phylogenetic studies with MjTX-I reveal a multi-oligomeric toxin-a novel feature in Lys49- PLA₂s protein class. **PLoS One**, v. 8, n. 4, p. e60610, 2013.

SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE; MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes de trabalho por animais peçonhentos entre trabalhadores do campo, floresta e águas, Brasil 2007 a 2017. **Boletim Epidemiológico**, v. 50, ed. 11, mar. 2019. Disponível em: < <https://portalarquivos2.saude.gov.br/images/pdf/2019/marco/29/2018-059.pdf>>. Acesso em: 12 ago. 2019.

SILVA, V.; RODRIGUES, M. (2008). Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa: Journal of Herpetology**, 7, 45-90. DOI: <https://doi.org/10.11606/issn.2316-9079.v7i1p45-90>.

WARRELL, David A. Venomous Bites, Stings, and Poisoning: An Update. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 33, n. 1, p. 17-38, Mar. 2019. DOI: <https://doi.org/10.1016/j.idc.2018.10.001>.

World Health Organization. **Rabies and envenomings: a neglected public health issue**. World Health Organization, Geneva, 10 jan. 2007. Disponível em: < <https://apps.who.int/iris/handle/10665/43858> >. Acesso em: 11 ago. 2019.