

RESSALVA

Atendendo solicitação do(a) autor(a), o texto completo desta dissertação será disponibilizado somente a partir de 16/05/2026.

unesp



IB

Instituto de
Biotecnologia
Unesp Botucatu

**Pós-graduação
Genética**
UNESP - Botucatu



**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
INSTITUTO DE BIOCÊNCIAS DE BOTUCATU
CÂMPUS DE BOTUCATU**

IVAN ROSSI MORAES

**PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA TOXINAS ENVOLVIDAS NA
MIONECROSE EM ACIDENTES BOTRÓPICOS POR ANÁLISES
ESTRUTURAIS**

Botucatu
2024

IVAN ROSSI MORAES

**EFEITOS DE MOLÉCULAS INIBIDORAS EM TOXINAS
ENVOLVIDAS NA NECROSE MUSCULAR LOCAL EM ACIDENTES
BOTRÓPICOS**

Dissertação apresentada ao Instituto de
Biotecnologia de Botucatu – UNESP como parte dos
requisitos para obtenção do título de Mestre no
Programa de Pós-Graduação em Ciências
Biológicas (Genética).

Orientador

Prof. Tit. Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador

Dr. Guilherme Henrique Marchi Salvador

Botucatu
2024

M827p

Moraes, Ivan Rossi

PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA TOXINAS ENVOLVIDAS NA
MIONECROSE EM ACIDENTES BOTRÓPICOS POR ANÁLISES ESTRUTURAIS /

Ivan Rossi Moraes. -- Botucatu, 2024

84 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Estadual Paulista (UNESP), Instituto de
Bióciências, Botucatu

Orientador: Marcos Roberto de Mattos Fontes

Coorientador: Guilherme Henrique Marchi Salvador

1. Snake toxins. 2. Molecular biophysics. 3. Bioinformática. 4. Serpente peçonhenta
Peçonha. 5. Doença negligenciada. I. Título.

Sistema de geração automática de fichas catalográficas da Unesp. Biblioteca da Universidade Estadual Paulista (UNESP),
Instituto de Biociências, Botucatu. Dados fornecidos pelo autor(a).

Essa ficha não pode ser modificada.

ATA DA DEFESA PÚBLICA DA DISSERTAÇÃO DE MESTRADO DE IVAN ROSSI MORAES, DISCENTE DO PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS BIOLÓGICAS (GENÉTICA), DO INSTITUTO DE BIOCIÊNCIAS - CÂMPUS DE BOTUCATU.

Aos 16 dias do mês de maio do ano de 2024, às 09:00 horas, no(a) Sala de Pós-Graduação do Instituto de Biociências de Botucatu, realizou-se a defesa de DISSERTAÇÃO DE MESTRADO de IVAN ROSSI MORAES, intitulada **PROSPECÇÃO DE INIBIDORES PARA TOXINAS ENVOLVIDAS NA MIONECROSE EM ACIDENTES BOTRÓPICOS POR ANÁLISES ESTRUTURAIS**. A Comissão Examinadora foi constituída pelos seguintes membros: Prof. Dr. MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES (Orientador(a) - Participação Presencial) do(a) Departamento de Biofísica e Farmacologia / Instituto de Biociências de Botucatu Unesp, Prof. Dr. PAULO EDUARDO MARTINS RIBOLLA (Participação Presencial) do(a) Departamento de Biodiversidade e Bioestatística / Instituto de Biociências - IB - Unesp - Câmpus de Botucatu, Prof. Dr. ANGELO JOSÉ MAGRO (Participação Presencial) do(a) Departamento de Bioprocessos e Biotecnologia / Faculdade de Ciências Agrônômicas de Botucatu - UNESP. Após a exposição pelo mestrando e arguição pelos membros da Comissão Examinadora que participaram do ato, de forma presencial e/ou virtual, o discente recebeu o conceito final: APROVADO . Nada mais havendo, foi lavrada a presente ata, que após lida e aprovada, foi assinada pelo(a) Presidente(a) da Comissão Examinadora.

Prof. Dr. MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES



Documento assinado digitalmente

MARCOS ROBERTO DE MATTOS FONTES

Data: 27/05/2024 14:57:45-0300

Verifique em <https://validar.iti.gov.br>

AGRADECIMENTOS

Ao meu orientador, Marcos Fontes.

Ao meu coorientador, Guilherme Salvador.

À Fundação de Amparo à Pesquisa de São Paulo (FAPESP) pela bolsa (2021/14841-3) e o projeto (2020/10143-7).

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior pela bolsa de estudos.

Ao Instituto de Física de São Carlos (IFSC) pelo uso do MST.

Aos colegas e amigos de laboratório Hamine e Fábio.

Aos meus amigos Gabriel, Marcel, Thiago, Renan, Deborah, Isadora, Rafael, Guilherme, Poliana, Cíntia, Tainá, Hugo e Augusto.

Aos meus pais, Tatiana e José Carlos, e minha irmã, Giulia.

RESUMO

Acidentes causados pelas serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops* geram um grande problema médico e social no Brasil, devido ao proeminente dano local que pode levar à amputação do membro atingido. Algumas proteínas presentes no veneno botrópico estão diretamente relacionadas ao proeminente dano local, entre elas estão as fosfolipases A_2 , fosfolipases *A₂-like*, metaloproteinases, serino proteases, L-aminoácido oxidases, lectinas tipo C e lectinas tipo *C-like* que atuam diretamente nos tecidos musculares. Considerando que os efeitos locais do veneno não são completamente neutralizados pelo soro antiofídico, há necessidade da busca por compostos que possam complementar a soroterapia. Desta forma, neste trabalho, são propostos estudos de termoforese em microescala e de bioinformática (*Docking* molecular e simulação de dinâmica molecular) com miotoxinas botrópicas e moléculas candidatas a inibi-las. Os experimentos de termoforese em microescala foram realizados com fosfolipases *A₂-like* e inibidores conhecidos, já os experimentos de bioinformática foram realizados com diversas classes de proteínas das serpentes *Bothrops* e os inibidores. Com os resultados obtidos neste trabalho, poderá se compreender melhor as interações e possíveis modificações estruturais que podem ser causadas pelos inibidores, além de também entender as bases estruturais que levam à inibição destas proteínas. Além disso, pretende-se verificar a possibilidade de moléculas inibidoras agirem de maneira simultânea em diferentes classes de toxinas.

Palavras-chave: Acidentes ofídicos; serpentes *Bothrops*; veneno de serpentes; inibidores de venenos botrópicos; termoforese em microescala; *Docking* molecular; simulação de dinâmica molecular.

ABSTRACT

Envenoming involving snakes from Bothrops genus can be considered a public health and social problem in Brazil, due their prominent local muscle damages, which can lead to limb amputation. Some proteins presented in bothropic venom are directly related to this local damage, among them are phospholipases A₂, phospholipases A₂-like, metalloproteinases, serine proteases, L-amino acid oxidases, C-type lectin and C-type lectin-like that act directly in the muscle tissues cells. Considering these effects are not fully reverted by the antiophidic serum administration, the search for new molecules is essential to complement the antivenom therapy. In this work, it's proposed the use of microscale thermophoresis and bioinformatics assays (molecular docking and molecular dynamics simulation) with bothropic myotoxins and candidate molecules for inhibiting them. The microscale thermophoresis assays were performed using phospholipase A₂-like and known inhibitors, and the bioinformatics assays were made using various proteins classes presented in bothropic venom and inhibitors. The results obtained here can led to observe the possible modifications in the protein structure by the inhibitor molecules and also, better comprehend the structural basis of the inhibitor binding to venom proteins. Furthermore, it was proposed to identify the possibility of known inhibitors molecules that will work simultaneously in different classes of toxins.

Keywords: *Snakebite; Bothrops snakes; snake venom; bothropic venom inhibitors; microscale thermophoresis; molecular docking; molecular dynamics simulation.*

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** **A.** Cromatografia de troca iônica em coluna CM-FF de 5 mL do veneno de *Bothrops moojeni*. A fração de número 3 corresponde a proteína MjTX-II. A linha em azul corresponde à absorbância a 280 nm e a linha verde corresponde ao gradiente do Tampão B. **B.** Gel de eletroforese em poliacrilamida a 12,5%, onde cada coluna representa as frações obtidas na cromatografia. Em destaque está uma proteína que apresenta massa de ~13 kDa. **C.** Cromatografia de fase reversa em coluna C-18 da fração de número 3 da cromatografia de troca iônica. A fração número 1 corresponde à proteína MjTX-II. A linha em azul corresponde à absorbância a 280 nm e a linha em verde corresponde ao gradiente de acetonitrila. **D.** Gel de eletroforese em poliacrilamida a 12,5% que representa a toxina MjTX-II com alto grau de pureza.....28
- Figura 2.** Dados do MST da interação entre a MjTX-II e o marimastat analisada pelo *software MO.Affinity Analysis* (**A**) e o *software PALMIST v.1.5.8* (**B**). Na imagem superior, está o sinal de fluorescência normalizado em relação ao tempo. Na imagem inferior está a curva de dose-resposta para a ligação da MjTX-II com o marimastat.....31
- Figura 3.** Dados do MST da interação entre a MjTX-II e o ácido aristolóquico analisada pelo *software MO.Affinity Analysis* (**A**) e o *software PALMIST v.1.5.8* (**B**). Na imagem superior, está o sinal de fluorescência normalizado em relação ao tempo. Na imagem inferior está a curva de dose-resposta para a ligação da MjTX-II com o ácido aristolóquico.....32
- Figura 4.** Dados do MST da interação entre a MjTX-II e o PMSF analisada pelo *software PALMIST v.1.5.8*. Na imagem superior, está o sinal de fluorescência normalizado em relação ao tempo. Na imagem inferior está a curva de dose-resposta para a ligação da MjTX-II com o PMSF.....32
- Figura 5.** Dados do MST da interação entre a MjTX-II e o thiodigalactoside analisada pelo *software PALMIST v.1.5.8*. Na imagem superior, está o sinal de fluorescência normalizado em relação ao tempo. Na imagem inferior estão os pontos de cada uma de quatro experimentos que não formam uma curva de dose-resposta entre a MjTX-II e o thiodigalactoside.....33
- Figura 6.** Dados do MST da interação entre a MjTX-II e a Hesperetina analisada pelo *software MO.Affinity Analysis* (**A**) e o *software PALMIST v.1.5.8* (**B**). Na imagem superior, está o sinal de fluorescência normalizado em relação ao tempo. Na imagem inferior está a curva de dose-resposta para a ligação da MjTX-II com a hesperetina.....34
- Figura 7.** Dados do MST da interação entre a MjTX-II e a suramina analisada pelo *software MO.Affinity Analysis* (**A**) e o *software PALMIST v.1.5.8* (**B**). Na imagem superior, está o sinal de fluorescência normalizado em relação ao tempo. Na imagem inferior está a curva de dose-resposta para a ligação da MjTX-II com a suramina.....35
- Figura 8.** Estrutura das toxinas e as posições das moléculas de marimastat obtidas por *docking* molecular. **A.** Complexo se ligando canal hidrofóbico e na hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B da PLA₂ básica. **C.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos e nos MDiS das cadeias A e B da PLA₂-like. **D.** Complexo se ligando no *loop* de zinco da MP-I. **E.** Complexo se ligando no *loop* de zinco, no *loop* de cálcio, no domínio tipo-desintegrina e no domínio rico em cisteína da MP-III. **F.** Complexo se ligando no sítio de glicosilação e na tríade catalítica da Serino protease. **G.** Complexo se ligando no SBD da cadeia A, no SBD e FDB da cadeia B e na interface dimérica da LAAO. **H.** Complexo se ligando no GBS, no SBS e na interface dimérica da Lectina tipo C. **I.** Complexo se ligando na interface da GPIb α e na interface do vWF-A1 da Lectina tipo C-like.....41
- Figura 9.** Estrutura das toxinas e as posições das moléculas de ácido aristolóquico obtidas por *docking* molecular. **A.** Complexo se ligando no canal hidrofóbico, na beta-wing e na hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B da PLA₂ básica. **C.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos e nos MDiS das cadeias A e B da

PLA₂-like. **D.** Complexo se ligando no *loop* de zinco com a MP-I. **E.** Complexo se ligando no *loop* de cálcio, no domínio tipo-desintegrina e no domínio rico em cisteína da MP-III. **F.** Complexo se ligando no sítio de glicosilação e na tríade catalítica da Serino protease. **G.** Complexo se ligando na interface dimérica e no FDB da cadeia A e B da LAAO. **H.** Complexo se ligando no GBS, no SBS e na interface dimérica da Lectina tipo C. **I.** Complexo se ligando na interface da GPIb α e na interface do vWF-A1 da Lectina tipo C-like.....43

Figura 10. Estrutura das toxinas e as posições das moléculas de PMSF obtidas por *docking* molecular. **A.** Complexo se ligando no canal hidrofóbico, na hélice 1 e 2 da PLA₂ ácida. **B.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B da PLA₂ básica. **C.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos e nos MDiS das cadeias A e B da PLA₂-like. **D.** Complexo se ligando no *loop* de zinco com a MP-I. **E.** Complexo se ligando no *loop* de zinco, *loop* de cálcio, no domínio tipo-desintegrina e no domínio rico em cisteína da MP-III. **F.** Complexo se ligando no sítio de glicosilação e na tríade catalítica da Serino protease. **G.** Complexo se ligando no SBD da cadeia A, no FDB da cadeia A e B e na interface dimérica da LAAO. **H.** Complexo se ligando no GBS, no SBS e na interface dimérica da Lectina tipo C. **I.** Complexo se ligando na interface da GPIb α da Lectina tipo C-like.....45

Figura 11. Estrutura das toxinas e as posições das moléculas de thiodigalactoside obtidas por *docking* molecular. **A.** Complexo se ligando no canal hidrofóbico e na hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B da PLA₂ básica. **C.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos e nos MDiS das cadeias A e B da PLA₂-like. **D.** Complexo se ligando no *loop* de zinco com a MP-I. **E.** Complexo se ligando no *loop* de cálcio, no domínio tipo-desintegrina e no domínio rico em cisteína da MP-III. **F.** Complexo se ligando na tríade catalítica da Serino protease. **G.** Complexo se ligando no FDB da cadeia A e na interface dimérica da LAAO. **H.** Complexo se ligando no GBS e na interface dimérica da Lectina tipo C. **I.** Complexo se ligando na interface da GPIb α da Lectina tipo C-like.....47

Figura 12. Estrutura das toxinas e as posições das moléculas de hesperetina obtidas por *docking* molecular. **A.** Complexo se ligando no canal hidrofóbico, na hélice 1 e 2 da PLA₂ ácida. **B.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B da PLA₂ básica. **C.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos e nos MDiS das cadeias A e B da PLA₂-like. **D.** Complexo se ligando no *loop* de zinco com a MP-I. **E.** Complexo se ligando no *loop* de zinco, *loop* de cálcio, no domínio tipo-desintegrina e no domínio rico em cisteína da MP-III. **F.** Complexo se ligando no sítio de glicosilação e na tríade catalítica da Serino protease. **G.** Complexo se ligando no SBD e FDB da cadeia A, no FDB da cadeia B e na interface dimérica da LAAO. **H.** Complexo se ligando no GBS, no SBS e na interface dimérica da Lectina tipo C. **I.** Complexo se ligando na interface da GPIb α e na interface do vWF-A1 da Lectina tipo C-like.....49

Figura 13. Estrutura das toxinas e as posições das moléculas de varespladib obtidas por *docking* molecular. **A.** Complexo se ligando no canal hidrofóbico e na hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B da PLA₂ básica. **C.** Complexo se ligando no *loop* de zinco com a MP-I. **D.** Complexo se ligando no *loop* de cálcio, no domínio tipo-desintegrina e no domínio rico em cisteína da MP-III. **E.** Complexo se ligando no sítio de glicosilação e na tríade catalítica da Serino protease. **F.** Complexo se ligando no SBD da cadeia A e na interface dimérica da LAAO. **G.** Complexo se ligando no GBS, no SBS e na interface dimérica da Lectina tipo C. **H.** Complexo se ligando na interface da GPIb α e na interface do vWF-A1 da Lectina tipo C-like.....51

Figura 14. Estrutura das toxinas e as posições das moléculas de suramina obtidas por *docking* molecular. **A.** Complexo se ligando no canal hidrofóbico e na hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Complexo se ligando nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B da PLA₂ básica. **C.** Complexo se ligando no *loop* de zinco com a MP-I. **D.** Complexo se ligando no *loop* de cálcio, no domínio tipo-desintegrina e no domínio rico em cisteína da MP-III. **E.** Complexo se ligando na tríade

catalítica da Serino protease. **F.** Complexo se ligando no SBD e no FDB da cadeia A e na interface dimérica da LAAO. **G.** Complexo se ligando no GBS, no SBS e na interface dimérica da Lectina tipo C. **H.** Complexo se ligando na interface da GPIb α e na interface do vWF-A1 da Lectina tipo C-like.....53

Figura 15. Gráficos de r.m.s.d. da molécula de marimastat ligada a diferentes classes de toxinas de *Bothrops*. **A.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico e em vermelho ligada a hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico B e em vermelho ligada ao canal hidrofóbico A da PLA₂ básica. **C.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico B, em vermelho ligada ao MDiS B, em verde ligada ao canal hidrofóbico A e em azul ligada ao MDiS A da PLA₂-like. **D.** Em preto ligada ao *loop* zinco da MP-I. **E.** Em preto ligada ao domínio tipo-desintegrina, em vermelho ligada ao *loop* de cálcio, em verde ligada ao domínio rico em cisteína e em azul ligada ao *loop* de zinco da MP-III. **F.** Em preto ligada ao sítio de glicosilação e em vermelho ligada a tríade catalítica da Serino protease. **G.** Em preto ligada a interface dimérica, em vermelho ligada ao FBD B, em verde ligada a interface dimérica, em azul ligada ao SBD A e em amarelo ligada ao SBD B da LAAO. **H.** Em preto ligada ao GBS, em vermelho ligada a interface dimérica e em verde ligada ao SBS da Lectina tipo C. **I.** Em preto ligada a interface da GPIb α e em vermelho ligada a interface do vWF-A1 da Lectina tipo C-like.....58

Figura 16. Estruturas dos complexos das toxinas com as moléculas de marimastat que se mantiveram em sua localização inicial após 100 ns da simulação de dinâmica molecular. **A.** Estrutura da PLA₂ básica com o marimastat ligado nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B. **B.** Estrutura da PLA₂-like com o marimastat ligado no canal hidrofóbico da cadeia A, no sítio MDiS e no canal hidrofóbico da cadeia B. **C.** Estrutura da MP-I com o marimastat ligado no *loop* de zinco. **D.** Estrutura da MP-III com o marimastat ligado no *loop* de zinco. **E.** Estrutura da Serino protease com o marimastat ligado na tríade catalítica. **F.** Estrutura da LAAO com o marimastat ligado na interface dimérica, no SBD da cadeia A, no FBD e SBD da cadeia B.....59

Figura 17. Gráficos de r.m.s.d. da molécula de ácido aristolóquico ligada a diferentes classes de toxinas de *Bothrops*. **A.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico, em vermelho ligada a beta-wing e verde ligada a hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico A e em vermelho ligada ao canal hidrofóbico B da PLA₂ básica. **C.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico B, em vermelho ligada ao canal hidrofóbico A, em verde ligada ao MDiS B e em azul ligada ao MDiS A da PLA₂-like. **D.** Em preto ligada ao *loop* zinco da MP-I. **E.** Em preto ligada ao *loop* de cálcio, em vermelho ligada ao domínio rico em cisteína e em verde ligada ao domínio tipo-desintegrina da MP-III. **F.** Em preto ligada ao sítio de glicosilação e em vermelho ligada a tríade catalítica da Serino protease. **G.** Em preto ligada ao FBD B, em vermelho ligada a interface dimérica e em verde ligada ao FBD A da LAAO. **H.** Em preto ligada ao GBS, em vermelho ligada ao SBS e em verde ligada a interface dimérica da Lectina tipo C. **I.** Em preto ligada a interface do vWF-A1 e em vermelho ligada a interface da GPIb α da Lectina tipo C-like.....62

Figura 18. Estruturas dos complexos das toxinas com as moléculas de ácido aristolóquico que se mantiveram em sua localização inicial após 100 ns da simulação de dinâmica molecular. **A.** Estrutura da PLA₂ básica com o ácido aristolóquico ligado no canal hidrofóbico da cadeia B. **B.** Estrutura da PLA₂-like com o ácido aristolóquico ligado nos canais hidrofóbicos e nos MDiS das cadeias A e B. **C.** Estrutura da Serino protease com o ácido aristolóquico ligado no sítio de glicosilação. **D.** Estrutura da LAAO com o ácido aristolóquico ligado na interface dimérica, no FBD da cadeia A e no FBD da cadeia B. **E.** Estrutura da Lectina tipo C-like com o ácido aristolóquico ligado na interface da GPIb α e na interface do vWF-A1.....63

Figura 19. Gráficos de r.m.s.d. da molécula de PMSF ligada a diferentes classes de toxinas de *Bothrops*. **A.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico, em vermelho ligada a hélice 2 e em verde ligada a hélice 1 da PLA₂ ácida. **B.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico B e em vermelho ligada ao canal hidrofóbico A da PLA₂ básica. **C.** Em preto ligada ao MDiS A, em vermelho

ligada ao MDiS B, em verde ligada ao canal hidrofóbico A e em azul ligada ao canal hidrofóbico B da PLA₂-like. **D.** Em preto ligada ao *loop* zinco da MP-I. **E.** Em preto ligada ao *loop* de zinco, em vermelho ligada ao domínio rico em cisteína, em verde ligada ao domínio tipo-desintegrina e em azul ligada ao *loop* de cálcio da MP-III. **F.** Em preto ligada a tríade catalítica e em vermelho ligada ao sítio de glicosilação da Serino protease. **G.** Em preto ligada ao FBD A, em vermelho ligada ao FBD B, em verde ligada ao SBD B, em azul ligada ligada à interface dimérica da LAAO. **H.** Em preto ligada ao GBS, em vermelho ligada a interface dimérica e em verde ligada ao SBS da Lectina tipo C. **I.** Em preto ligada a interface da GPIbα da Lectina tipo C-like.....66

Figura 20. Estruturas dos complexos das toxinas com as moléculas de PMSF que se mantiveram em sua localização inicial após 100 ns da simulação de dinâmica molecular. **A.** Estrutura da PLA₂ com o PMSF ligado na hélice 1. **B.** Estrutura da PLA₂ básica com o PMSF ligado no canal hidrofóbico das cadeias A e B. **C.** Estrutura da PLA₂-like com o PMSF ligado no canal hidrofóbico e MDiS da cadeia A e no MDiS da cadeia B. **D.** Estrutura da LAAO com o PMSF ligado na interface dimérica e no FBD da cadeia B.....67

Figura 21. Gráficos de r.m.s.d. da molécula de thiodigalactoside ligada a diferentes classes de toxinas de *Bothrops*. **A.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico e em vermelho ligada a hélice 2 da PLA₂ ácida. **B.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico A e em vermelho ligada ao canal hidrofóbico B da PLA₂ básica. **C.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico B, em vermelho ligada ao MDiS A, em verde ligada ao MDiS B e em azul ligada ao canal hidrofóbico A da PLA₂-like. **D.** Em preto ligada ao *loop* zinco da MP-I. **E.** Em preto ligada ao *loop* de cálcio, em vermelho ligada ao domínio tipo-desintegrina e em verde ligada ao domínio rico em cisteína da MP-III. **F.** Em preto ligada a tríade catalítica da Serino protease. **G.** Em preto ligada a interface dimérica, em vermelho ligada a interface dimérica e em verde ligada ao FBD B da LAAO. **H.** Em preto ligada à interface dimérica e em vermelho ligada ao GBS da Lectina tipo C. **I.** Em preto ligada a interface da GPIbα da Lectina tipo C-like.....70

Figura 22. Estruturas dos complexos das toxinas com as moléculas de thiodigalactoside que se mantiveram em sua localização inicial após 100 ns da simulação de dinâmica molecular. **A.** Estrutura da PLA₂ básica com o thiodigalactoside ligado no canal hidrofóbico das cadeias A e B. **B.** Estrutura da PLA₂-like com o thiodigalactoside ligado no canal hidrofóbico da cadeia A, no MDiS e no canal hidrofóbico da cadeia B. **C.** Estrutura da MP-I com o thiodigalactoside ligado no *loop* de zinco. **D.** Estrutura da LAAO com o thiodigalactoside ligado na interface dimérica e no FBD da cadeia B.....71

Figura 23. Gráficos de r.m.s.d. da molécula de hesperetina ligada a diferentes classes de toxinas de *Bothrops*. **A.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico, em vermelho ligada a hélice 2 e ligada a hélice 1 da PLA₂ ácida. **B.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico B e em vermelho ligada ao canal hidrofóbico A da PLA₂ básica. **C.** Em preto ligada ao MDiS B, em vermelho ligada ao MDiS A, em verde ligada ao canal hidrofóbico B e em azul ligada ao canal hidrofóbico A da PLA₂-like. **D.** Em preto ligada ao *loop* zinco da MP-I. **E.** Em preto ligada ao *loop* de zinco, em vermelho ligada ao domínio rico em cisteína, em verde ligada ao domínio tipo-desintegrina e em azul ligada ao *loop* de cálcio da MP-III. **F.** Em preto ligada ao sítio de glicosilação e em vermelho ligada a tríade catalítica da Serino protease. **G.** Em preto ligada ao FBD A, em vermelho ligada a SBD A, em verde ligada ao FBD B e ligada à interface dimérica da LAAO. **H.** Em preto ligada a interface dimérica, em vermelho ligada ao GBS e em verde ligada ao SBS da Lectina tipo C. **I.** Em preto ligada a interface da GPIbα e em vermelho ligada a interface do vWF-A1 da Lectina tipo C-like.....74

Figura 24. Estruturas dos complexos das toxinas com as moléculas de hesperetina que se mantiveram em sua localização inicial após 100 ns da simulação de dinâmica molecular. **A.** Estrutura da PLA₂ ácida com a hesperetina ligada nas hélices 1 e 2. **B.** Estrutura da PLA₂ básica com a hesperetina ligada no canal hidrofóbico da cadeia B. **C.** Estrutura da PLA₂-like com a

hesperetina ligada nos canais hidrofóbicos e nos MDiS das cadeias A e B. **D.** Estrutura da Serino protease com a hesperetina ligada no sítio de glicosilação. **E.** Estrutura da LAAO com a hesperetina ligada na interface dimérica, no FBD e SBD da cadeia A e no FBD da cadeia B. **F.** Estrutura da Lectina tipo C com a hesperetina ligada no SBS.....75

Figura 25. Gráficos de r.m.s.d. da molécula de varespladib ligada a diferentes classes de toxinas de *Bothrops*. **A.** Em preto ligada a hélice 2 e em vermelho ligado ao canal hidrofóbico da PLA₂ ácida. **B.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico B e em vermelho ligada ao canal hidrofóbico A da PLA₂ básica. **C.** Em preto ligada ao *loop* zinco da MP-I. **D.** Em preto ligada ao domínio tipo-desintegrina, em vermelho ligada ao *loop* de cálcio e em verde ligada ao domínio rico em cisteína da MP-III. **E.** Em preto ligada ao sítio de glicosilação e em vermelho ligada a tríade catalítica da Serino protease. **F.** Em preto ligada a interface dimérica e em vermelho ao SBD A da LAAO. **G.** Em preto ligada ao SBS, em vermelho ligada ao GBS e em verde ligada a interface dimérica da Lectina tipo C. **H.** Em preto ligada a interface do vWF-A1 e em vermelho ligada a interface da GPIb α Lectina tipo *C-like*.....78

Figura 26. Estruturas dos complexos das toxinas com as moléculas de varespladib que se mantiveram em sua localização inicial após 100 ns da simulação de dinâmica molecular. **A.** Estrutura da PLA₂ básica com o varespladib ligado nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B. **B.** Estrutura da MP-I com o varespladib ligado no *loop* de zinco. **C.** Estrutura da MP-III com o varespladib ligado no domínio tipo-desintegrina. **D.** Estrutura da Serino protease com o varespladib ligado no sítio de glicosilação e na tríade catalítica. **E.** Estrutura da LAAO com o varespladib ligado no SBD da cadeia A e na interface dimérica.....79

Figura 27. Gráficos de r.m.s.d. da molécula de suramina ligada a diferentes classes de toxinas de *Bothrops*. **A.** Em preto ligada a hélice 2 e ao canal hidrofóbico da PLA₂ ácida. **B.** Em preto ligada ao canal hidrofóbico A e B da PLA₂ básica. **C.** Em preto ligada ao *loop* zinco da MP-I. **D.** Em preto ligada ao domínio tipo-desintegrina e em vermelho ligada ao *loop* de cálcio e ao domínio rico em cisteína da MP-III. **E.** Em preto ligada a tríade catalítica da Serino protease. **F.** Em preto ligada ao SBD B e ao domínio FBD B e em vermelho ligada a interface dimérica da LAAO. **G.** Em preto ligada ao SBS e a interface dimérica e em vermelho ligada ao GBS da Lectina tipo C. **H.** Em preto ligada a interface da GPIb α e em vermelho ligada a interface do vWF-A1 da Lectina tipo *C-like*.....82

Figura 28. Estruturas dos complexos das toxinas com as moléculas de suramina que se mantiveram em sua localização inicial após 100 ns da simulação de dinâmica molecular. **A.** Estrutura da PLA₂ ácida com a suramina ligada no canal hidrofóbico e na hélice 2. **B.** Estrutura da PLA₂ básica com a suramina ligada nos canais hidrofóbicos das cadeias A e B. **C.** Estrutura da MP-I com a suramina ligada no *loop* de zinco. **D.** Estrutura da MP-III com a suramina ligada no *loop* de cálcio, no domínio rico em cisteína e no domínio tipo-desintegrina. **E.** Estrutura da Serino protease com a suramina ligada na tríade catalítica. **F.** Estrutura da LAAO com a suramina ligada na interface dimérica, no FBD e SBD da cadeia B. **G.** Estrutura da Lectina tipo *C-like* com a suramina ligada na interface da GPIb α e na interface do vWF-A1.....83

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Comparação entre a afinidade obtida entre os ligantes deste estudo e a miotoxina MjTX-II e diferentes toxinas PLA ₂ -like botrópicas.....	30
Tabela 2. Relação das proteínas com suas localizações importantes em que os potenciais inibidores se ligaram.....	36
Tabela 3. ΔG (Kd calculado) das moléculas candidatas ligadas às posições específicas das proteínas PLA ₂ ácida, PLA ₂ básica e PLA ₂ -like. As localizações que a molécula não interagiu são representadas por “X”. Os complexos que já foram descritos na literatura são representados por “X*”.....	37
Tabela 4. ΔG (Kd calculado) das moléculas candidatas ligadas às posições específicas das proteínas MP-I, MP-III e Serino protease. As localizações que a molécula não interagiu são representadas por “X”.....	38
Tabela 5. ΔG (Kd calculado) das moléculas candidatas ligadas às posições específicas das proteínas LAAO, Lectina tipo C e Lectina tipo C-like. As localizações que a molécula não interagiu são representadas por “X”.....	39
Tabela 6. Esquema de todas as moléculas com potenciais inibidores e as toxinas de <i>Bothrops</i> estudadas após a simulação de dinâmica molecular. O símbolo “✓” representa os complexos em que o potencial inibidor manteve interação com a proteína depois dos 100 ns de simulação. O símbolo “X” representa os complexos em que o potencial inibidor não manteve interação com a proteína depois dos 100 ns de simulação. O símbolo “✓*” representa os complexos que já estão presentes na literatura.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

OMS - Organização Mundial de Saúde

PLA₂ - Fosfolipase A₂

LAAO - L-aminoácido oxidases

MDiS - Sítio de ruptura de membrana

MP - Metaloproteinase

ADP – Adenosina difosfato

FAD - Dinucleotídeo de flavina e adenina

vWF - Fator de *von Willebrand*

PMSF - Fluoreto de fenilmetilsulfonil

SDS - Dodecil sulfato de sódio

PAGE - Eletroforese em gel de poliacrilamida

K_d – Constante de dissociação

ΔG - Energia livre de Gibbs

FBD - Domínio de ligação de FAD

SBD - Domínio de ligação de substrato

GBS - Sítio de ligação de galactose

SBS - Sítio de ligação de sódio

GPIb - Glicoproteína Ib

r.m.s.d. - *Root mean square deviation*

SUMÁRIO

1. Introdução	14
1.1. Importância dos acidentes ofídicos.....	14
1.2. Moléculas presentes no veneno de <i>Bothrops</i>	15
1.2.1. PLA2.....	16
1.2.2. PLA2-like	16
1.2.3. Metaloproteinase.....	17
1.2.4. Serino protease	18
1.2.5. L-aminoácido oxidases (LAAO)	18
1.2.6. Lectina tipo C	19
1.2.7. Lectina tipo C-like.....	19
1.3. Potenciais inibidores	20
1.3.1. Marimastat	21
1.3.2. Ácido aristolóquico	21
1.3.3. Fluoreto de fenilmetilsulfonil	21
1.3.4. Thiodigalactoside	21
1.3.5. Hesperetina	22
1.3.6. Varespladib.....	22
1.3.7. Suramina.....	22
2. Objetivo.....	22
3. Métodos.....	23
3.1. Purificação das toxinas e obtenção dos inibidores	23
3.2. Termoforese em microescala	23
3.3. Bioinformática.....	24
3.3.1. <i>Docking</i> molecular	25
3.3.2. Simulações de dinâmica molecular.....	26
4. Resultados.....	27
4.1. Obtenção de amostra	27
4.2. Termoforese em microescala	29
4.2.1. Marimastat	31
4.2.2. Ácido aristolóquico	31
4.2.3. PMSF.....	32
4.2.4. Thiodigalactoside	33
4.2.5. Hesperetina	33
4.2.6. Suramina.....	34
4.3. <i>Docking</i> molecular	35
4.3.1. Marimastat	40
4.3.2. Ácido aristolóquico	42
4.3.3. PMSF.....	44

4.3.4. Thiodigalactoside	46
4.3.5. Hesperetina	48
4.3.6. Varespladib.....	50
4.3.7. Suramina.....	52
4.4. Simulações de dinâmica molecular.....	54
4.4.1. Marimastat	56
4.4.2. Ácido aristolóquico	60
4.4.3. PMSF.....	64
4.4.4. Thiodigalactoside	67
4.4.5. Hesperetina	71
4.4.6. Varespladib.....	76
4.4.7. Suramina.....	80
5. Discussão.....	84
5.1. Marimastat	84
5.2. Ácido aristolóquico	84
5.3. PMSF.....	85
5.4. Thiodigalactoside	85
5.5. Hesperetina	86
5.6. Varespladib.....	86
5.7. Suramina.....	86
6. Conclusão.....	87
7. Referências.....	88

1. Introdução

1.1. Importância dos acidentes ofídicos

Serpentes peçonhentas de importância médica estão distribuídas por mais de 160 países do globo. Devido à deficiência na obtenção de dados sobre os acidentes ofídicos, estima-se que anualmente, entre 4,5 e 5,4 milhões de pessoas são envolvidas em acidentes ofídicos, sendo que entre 1,8 e 2,7 milhões de pessoas afetadas, apresentam problemas médicos relacionados ao envenenamento. Esses acidentes causam mais de 400 mil amputações e podem causar entre 81 a 138 mil mortes por ano. Devido aos impactos financeiros e sociais, em junho de 2017 a Organização Mundial de Saúde (OMS) classificou os acidentes ofídicos como uma doença negligenciada (GUTIERREZ *et al.*, 2017a; KASTURIRATNE *et al.*, 2008; WHO, 2018; WILLIAMS *et al.*, 2019).

Na América Latina, 85% dos casos de acidentes ofídicos são relacionados às serpentes do gênero *Bothrops* (CARDOSO *et al.*, 2009; GUTIERREZ *et al.*, 2011; KASTURIRATNE *et al.*, 2008). Serpentes do gênero *Bothrops* são membros da subfamília Crotalinae e são de grande interesse científico, médico e social no Brasil, pois são responsáveis pela grande maioria dos acidentes ofídicos que ocorrem no país (CARDOSO *et al.*, 2009). Um dos principais problemas associados ao envenenamento botrópico é o proeminente dano local causado, que em casos mais severos podem evoluir para necrose do músculo esquelético do local afetado (GUTIERREZ *et al.*, 2009b). Atualmente, a administração de antivenenos de origem animal (soro antiofídico) consta como único tratamento específico disponível para o envenenamento de serpentes (GUTIERREZ *et al.*, 2017b). Estes antivenenos são compostos por imunoglobulinas, sendo constituídos de moléculas de IgG inteiras (~150kDa), ou seus fragmentos F(ab')₂ ou Fab (GUTIERREZ *et al.*, 2013; LALLOO & THEAKSTON, 2003; OTERO *et al.*, 2006). Apesar do sucesso dessa terapia na neutralização das toxinas envolvidas

pelos efeitos sistêmicos, o soro apresenta limitada eficácia na proteção do estabelecimento da mionecrose local (WARRELL, 2010). Esta limitação pode ser explicada pelas propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas destes anticorpos *in vivo* (GUTIERREZ *et al.*, 1998; GUTIERREZ & OWNBY, 2003). Assim sendo, possíveis alternativas para o avanço no tratamento deste problema são: *i*) a identificação dos componentes envolvidos no processo e o entendimento das bases moleculares para seus mecanismos de ação, e *ii*) o conhecimento de moléculas com propriedades farmacocinéticas e farmacodinâmicas mais adequadas para a neutralização das toxinas de ação local.

1.2. Moléculas presentes no veneno de *Bothrops*

O estabelecimento da mionecrose é um evento complexo que também pode envolver a ação combinada de diversos componentes que estão presentes nas peçonhas de serpentes (ESCALANTE *et al.*, 2011; GUTIERREZ *et al.*, 2009a; GUTIERREZ & OWNBY, 2003; GUTIERREZ *et al.*, 2008; GUTIERREZ *et al.*, 2005; HARRIS & CULLEN, 1990; LOMONTE *et al.*, 2003; MORA-OBANDO *et al.*, 2014b; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WALLNOEFER *et al.*, 2010). As peçonhas de serpentes são compostas por uma mistura de diferentes moléculas que apresentam distintas propriedades biológicas, sendo aproximadamente 90% de seu peso seco constituído por proteínas, como por exemplo, fosfolipases A₂ (PLA₂s) básicas e ácidas, toxinas PLA₂-like, metaloproteínas, de classe I e III, serino proteases, L-aminoácido oxidases (LAAO), lectinas tipo C e lectinas tipo C-like (BAILEY & WILCE, 2001; MATSUI *et al.*, 2000). Essas classes de toxinas presentes na peçonha de serpentes *Bothrops* levam a efeitos como a inflamação, hemorragia, edema, dor e mionecrose, que acabam por causar severos danos locais (DE SOUZA *et al.*, 2015; ESCALANTE *et al.*, 2011; FERNANDES *et al.*, 2007; FERRAZ *et al.*, 2019; GALVAO NASCIMENTO *et al.*, 2010; GUTIERREZ *et al.*, 2009a; GUTIERREZ & OWNBY, 2003;

GUTIERREZ *et al.*, 2008; GUTIERREZ *et al.*, 2005; HARRIS & CULLEN, 1990; LOMONTE *et al.*, 2003; MAMEDE *et al.*, 2016; MAMEDE *et al.*, 2020; MORA-OBANDO *et al.*, 2014b; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WALLNOEFER *et al.*, 2010; ZYCHAR *et al.*, 2010).

1.2.1. PLA₂

As fosfolipases A₂ de serpentes são enzimas extracelulares amplamente estudadas por estarem envolvidas em importantes atividades farmacológicas, podendo ter efeitos citotóxicos, miotóxicos, anticoagulantes, inflamatórios e neurotóxicos. Além de estudos que essa classe de toxina tem demonstrado efeitos antimicrobianos e antineoplásicos (ANDRILAO-ESCARSO *et al.*, 2002; GUTIERREZ & OWNBY, 2003; SAMPAT *et al.*, 2023). Estas enzimas possuem baixa massa molecular (12 a 15 kDa) e apresentam entre 119 e 143 aminoácidos em sua estrutura primária. Atuam hidrolisando a ligação éster *sn*-2 dos fosfolipídios, liberando assim lisofosfolipídios, ácidos graxos e ácido aracdônico (precursor de eicosanóides, que atuam como mediadores inflamatórios) (ARNI & WARD, 1996; OWNBY *et al.*, 1999). As PLA₂s possuem o resíduo de ácido aspártico na posição 49, sendo este de grande importância para a coordenação do íon Ca⁺²; juntamente com outros aminoácidos, este auxilia na fixação do substrato ao sítio enzimático, sendo assim fundamental para a expressão da atividade catalítica nesta classe de proteínas (ARNI & WARD, 1996).

1.2.2. PLA₂-like

As toxinas PLA₂s-like apresentam a substituição do aminoácido ácido aspártico na posição 49 por aminoácidos do tipo lisina, serina ou arginina, sendo então conhecidas como Lys49-PLA₂s, Ser49-PLA₂s e Arg49-PLA₂s respectivamente. Em serpentes do gênero *Bothrops*, podemos encontrar as Lys49-PLA₂-like, que são caracterizadas por serem cataliticamente inativas, pois a ligação do íon Ca⁺² no sítio ativo é impedido por diferentes

fatores estruturais, como por exemplo, as mutações dos resíduos Asp49→Lys e Tyr28→Asn (FERNANDES *et al.*, 2010; HOLLAND *et al.*, 1990). Sendo assim, baseando-se em estudos estruturais propostos recentemente, o modo em que as toxinas PLA₂-like expressam a sua atividade miotóxica é por meio de dois sítios principais: o sítio em que a toxina realiza contato com a membrana "*Membrane Docking Site - MDoS*" composto por aminoácidos de caráter básico e; uma região hidrofóbica da toxina, composta pelos resíduos leucina (Leu121) e fenilalanina (Phe125), a qual seria responsável pela ruptura da membrana, chamada de "*Membrane Disrupt Site - MDiS*" (FERNANDES *et al.*, 2013). O mecanismo para a ação das toxinas PLA₂-like pode ser resumidamente apresentado por 5 passos principais: 1º) entrada de um substrato (ácidos graxos) no canal hidrofóbico da toxina; 2º) Ativação alostérica da toxina e alinhamento dos sítios funcionais; 3º) Ligação da toxina na membrana através do MDoS; 4º) Rompimento da membrana celular pela ação do MDiS; 5º) Morte celular causada pelo influxo descontrolado de íons (BORGES *et al.*, 2017; FERNANDES *et al.*, 2014; SALVADOR *et al.*, 2015).

1.2.3. Metaloproteinase

As metaloproteinases de veneno de serpentes são classificadas de I a III de acordo com sua organização em domínios. Possuem papel importante no estabelecimento da mionecrose pois grande parte destas proteínas pode induzir hemorragia local e sistêmica. O processo de hemorragia causada por estas proteínas se dá por sua atuação sob componentes da membrana basal de vasos sanguíneos, causando assim, o rompimento dos mesmos, seguido da deficiência do suprimento sanguíneo da região afetada (ESCALANTE *et al.*, 2011; GUTIERREZ *et al.*, 2009b; OLIVEIRA *et al.*, 2010; WALLNOEFER *et al.*, 2010). As metaloproteinases de classe I (MP-I) são consideradas as mais simples e menos hemorrágicas por terem apenas um domínio metaloproteinase, contendo um sítio de ligação de zinco, e são enzimas proteolíticas

(TAKEDA *et al.*, 2012). As MP-II são mais raras e compostas por um domínio metaloproteinase e um domínio desintegrina. As MP-III são as mais complexas e são compostas pelo domínio metaloproteinase, domínio tipo-desintegrina e domínio rico em cisteína. O domínio tipo-desintegrina, que contém pelo menos um sítio de ligação de cálcio, são capazes de se ligar a receptores integrina na superfície das células para que os outros domínios possam executar suas funções em células específicas e também impedindo os ligantes naturais se ligarem a essa integrina (FOX & SERRANO, 2005), já o domínio rico em cisteína impede a agregação plaquetária estimulada por colágeno mas não impede a agregação estimulada por adesinas difosfato (ADP), indicando que ocorre uma interação com a integrina $\alpha 2\beta 1$ das plaquetas (JIA *et al.*, 2000; KAMIGUTI *et al.*, 2003).

1.2.4. Serino protease

As serino proteases de venenos de serpentes são glicoproteínas que atuam em fatores de cascata de coagulação e em outros componentes do sistema hemostático da região afetada (BOLDRINI-FRANCA *et al.*, 2020; GUTIERREZ *et al.*, 2005; SERRANO & MAROUN, 2005). Essas serino proteases são definidas por uma tríade catalítica composta por um resíduo serina altamente reativo essencial para a formação do complexo enzimático, além dos resíduos ácido aspártico e histidina que fazem a estabilização do complexo (BARRETT & RAWLINGS, 1995). Essas serino protease também contém um sítio de glicosilação onde ocorre a ligação dos carboidratos, que são importantes para a estrutura e função enzimas glicosiladas (DESHIMARU *et al.*, 1996).

1.2.5. L-aminoácido oxidases (LAAO)

As LAAO são glicoproteínas que ligam em FAD estão envolvidas nos processos hemorrágicos e também atuando diretamente nas células musculares causando apoptose

(MACHADO *et al.*, 2019; SOUZA *et al.*, 1999). Essas enzimas geralmente são homodiméricas e consistem em um domínio de ligação de dinucleotídeo de flavina e adenina (FAD), um domínio de ligação de substrato e um domínio helical. O domínio de ligação de substrato e o domínio helical formam uma interface em forma de funil que dá ao substrato acesso ao sítio ativo (DU & CLEMETSON, 2002; PAWELEK *et al.*, 2000). O FAD é uma flavina que serve com um co-fator dessa enzima e contribui na formação de H₂O₂ que leva ao estresse oxidativo (GUO *et al.*, 2012).

1.2.6. Lectina tipo C

As lectinas tipo C de serpentes se geralmente se conformam em homodímeros e se ligam em carboidratos, atuando na modulação da hemaglutinação, indução do agregamento de plaquetas, liberação de íons de cálcio do músculo esquelético, nefrotoxicidade, indução de edema e hipotensão (ABREU *et al.*, 2006; BRAGA *et al.*, 2006; HAVT *et al.*, 2005; LIMA, 2009; OGILVIE *et al.*, 1989; OHKURA *et al.*, 1996; PANUNTO *et al.*, 2006). Essas lectinas tem um domínio de reconhecimento de carboidrato, comumente em serpentes sendo de galactose, que é coordenado por um íon cálcio (LU *et al.*, 2005; OGAWA *et al.*, 2005). Além disso, as lectinas também podem ter outros domínios, como um sítio de ligação de sódio, porém sua função ainda não é bem compreendida (WALKER *et al.*, 2004).

1.2.7. Lectina tipo C-like

Já as lectinas tipo C-like de serpentes são comumente conhecidas por serem heterodímeros que interagem com os fatores IX e X, trombina, protrombina, fator de *von Willebrand* e plaquetas e desencadeiam efeitos anticoagulantes no sangue e moduladores em relação a aglutinação e/ou agregação plaquetária (HIROTSU *et al.*, 2001; LIMA, 2009; LU *et al.*, 2005; MATSUSHITA *et al.*, 2000; MIZUNO *et al.*, 2001; MONTEIRO & ZINGALI,

2000; SHIKAMOTO *et al.*, 2003). Essas lectinas tipo *C-like* necessitam de um co-fator, como o fator de *von Willebrand* (vWF), para que consigam interagir com componentes das plaquetas (MORITA, 2005; SEN *et al.*, 2001).

1.3. Potenciais inibidores

Visando complementar a soroterapia, que pode possuir baixa eficácia na prevenção dos danos locais causados por algumas toxinas do veneno (GUTIERREZ *et al.*, 2014; GUTIERREZ & OWNBY, 2003; WARRELL, 2010), há a necessidade de melhor compreender o processo de mionecrose causado pelos componentes que estão presentes no veneno, bem como conhecer o modo de interação proteína/inibidor. Sendo assim, é possível apresentar uma alternativa complementar ao tratamento do envenenamento ofídico, visto que novas moléculas podem apresentar uma melhor farmacocinética nos organismos vivos. Por isso, é essencial a busca por moléculas candidatas a inibidores e compreender suas estruturas quando ligadas às principais classes de toxinas de *Bothrops*.

Os inibidores escolhidos para esses estudos foram selecionados por apresentarem capacidade inibitória em diferentes classes de toxinas de serpente e uma toxicidade aceitável a células de mamíferos. As moléculas escolhidas foram o marimastat (ARIAS *et al.*, 2017; TONN *et al.*, 1999), ácido aristolóquico (BHATTACHARJEE *et al.*, 2017; BHATTACHARJEE & BHATTACHARYYA, 2013), PMSF (PINSKY, 1982; SANT'ANA *et al.*, 2008), thiodigalactoside (ITO *et al.*, 2011; OZEKI *et al.*, 1994), hesperetina (DOS SANTOS *et al.*, 2021; EFSA, 2010), varespladib (BRYAN-QUIROS *et al.*, 2019; DENNIS *et al.*, 2011) e suramina (FERNANDES *et al.*, 2007; LIN-SHIAU & LIN, 1999).

1.3.1. Marimastat

O composto sintético Marimastat é conhecido como um inibidor de metaloproteinases de matriz (WHITTAKER *et al.*, 1999), e também foi citado na literatura como um potencial inibidor de metaloproteinase de serpentes (CHOWDHURY *et al.*, 2022; LAYFIELD *et al.*, 2020; STEWARD & THOMAS, 2000; VIVAS-RUIZ *et al.*, 2023).

1.3.2. Ácido aristolóquico

O composto de natural ácido aristolóquico, presente em plantas das espécies *Aristolochia* e *Asarum*, é usado desde dos tempos antigos pela medicina tradicional para uma grande variedade de enfermidades, como febre, infecções, inflamação, diarréia e envenenamento por escorpiões e serpentes (JORDAN & PERWAIZ, 2014). O composto foi citado na literatura como um inibidor de PLA₂ (DEY *et al.*, 2021; GONZALEZ *et al.*, 2020; XIMENES *et al.*, 2012) e LAAO (BHATTACHARJEE *et al.*, 2017; BHATTACHARJEE & BHATTACHARYYA, 2013) de serpentes.

1.3.3. Fluoreto de fenilmetilsulfonil

O composto sintético fluoreto de fenilmetilsulfonil (PMSF) conhecido como um inibidor de esterases e proteases (FAHRNEY & GOLD, 1963), foi citado na literatura como um potencial inibidor de Serino protease (WIEZEL *et al.*, 2019; ZAQUEO *et al.*, 2014) e LAAO (EL HAKIM *et al.*, 2015; NIELSEN, 2019) de serpentes.

1.3.4. Thiodigalactoside

O composto sintético Thiodigalactoside conhecido como um inibidor de lectinas (CUMPSTEY *et al.*, 2005; LEFFLER & BARONDES, 1986) foi citado na literatura como um potencial inibidor de Lectina tipo C de serpentes (HAMAKO *et al.*, 2007; OZEKI *et al.*, 1994).

1.3.5. Hesperetina

O composto natural Hesperetina é comumente encontrado em frutas do gênero *Citrus* e é conhecido por sua atividade anti-inflamatória, anti-cancerígena, neuroprotetiva, cardioprotetiva e antidiabético (ADAN & BARAN, 2015; ROOHBAKHSH *et al.*, 2015; SHARMA *et al.*, 2015; XIE *et al.*, 2023). Esse composto também foi citado na literatura como um potencial inibidor de Serino protease de serpentes (DOS SANTOS *et al.*, 2021; DOS SANTOS *et al.*, 2018).

1.3.6. Varespladib

O composto sintético varespladib foi inicialmente criado para ser um inibidor de PLA₂ secretória (DENNIS *et al.*, 2011) e já foi citado na literatura como um potencial inibidor de PLA₂ (BRYAN-QUIROS *et al.*, 2019; LEWIN *et al.*, 2022) e de PLA₂-like (SALVADOR *et al.*, 2019) de serpentes.

1.3.7. Suramina

O composto sintético suramina foi inicialmente criado com um antiparasitário há mais de 100 anos (WIEDEMAR *et al.*, 2020), porém também foi citado na literatura como um inibidor de PLA₂-like (MURAKAMI *et al.*, 2005; SALVADOR *et al.*, 2015; SALVADOR *et al.*, 2018) e Serino protease (FERNANDES *et al.*, 2007; ULLAH *et al.*, 2018) de serpentes.

6. Conclusão

Os dados obtidos nos experimentos de afinidade em conjunto com os de bioinformática levam a concluir que marimastat e ácido aristolóquico tem potencial como moléculas inibidoras de toxinas *PLA₂-like*, e essa moléculas em conjunto com o varespladib e a suramina tem potenciais inibir de múltiplas classes de toxinas presentes nas peçonhas das serpentes do gênero *Bothrops* e que atuam de forma simultânea. Também é importante citar que o MST não foi capaz de separar os dois eventos de ligação da suramina e MjTX-II, sendo assim é necessário considerar isso dependendo de como a moléculas se comporta em quando se liga a toxina. Os resultados desse trabalho auxiliam na busca de potenciais moléculas inibidoras, porém são necessários mais estudos funcionais e farmacológicos para que possa ocorrer adição dessas moléculas à soroterapia. Esses dados de possíveis inibidores são valiosos em um possível aprimoramento deste tratamento ao acometido, reduzindo os danos causados. Além disso, podemos sugerir novos estudos farmacológicos envolvendo uma junção das moléculas apresentadas aqui de forma independente à soroterapia, podendo servir como uma forma de tratamento alternativo.

7. Referências

- ABRAHAM, M. J., MURTOLA, T., SCHULZ, R., PÁLI, S., SMITH, J. C., HESS, B., LINDAHL, E. GROMACS: High performance molecular simulations through multi-level parallelism from laptops to supercomputers. *SoftwareX*, 1-2, p. 19-25, 2015.
- ABREU, P. A.; ALBUQUERQUE, M. G.; RODRIGUES, C. R.; CASTRO, H. C. Structure-function inferences based on molecular modeling, sequence-based methods and biological data analysis of snake venom lectins. *Toxicon*, 48, n. 6, p. 690-701, 2006.
- ADAN, A.; BARAN, Y. The pleiotropic effects of fisetin and hesperetin on human acute promyelocytic leukemia cells are mediated through apoptosis, cell cycle arrest, and alterations in signaling networks. *Tumour Biol*, 36, n. 11, p. 8973-8984, 2015.
- ANDRILAO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; FONTES, M. R.; FULY, A. L. *et al.* Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A₂ from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochem Pharmacol*, 64, n. 4, p. 723-732, 2002.
- ARIAS, A. S.; RUCAVADO, A.; GUTIERREZ, J. M. Peptidomimetic hydroxamate metalloproteinase inhibitors abrogate local and systemic toxicity induced by *Echis ocellatus* (saw-scaled) snake venom. *Toxicon*, 132, p. 40-49, 2017.
- ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A₂--a structural review. *Toxicon*, 34, n. 8, p. 827-841, 1996.
- BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. *Emerg Med (Fremantle)*, 13, n. 1, p. 28-36, 2001.
- BARRETT, A. J.; RAWLINGS, N. D. Families and clans of serine peptidases. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 318, n. 2, p. 247-250, 1995.
- BHATTACHARJEE, P.; BERA, I.; CHAKRABORTY, S.; GHOSHAL, N. *et al.* Aristolochic acid and its derivatives as inhibitors of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*, 138, p. 1-17, 2017.
- BHATTACHARJEE, P.; BHATTACHARYYA, D. Characterization of the aqueous extract of the root of *Aristolochia indica*: evaluation of its traditional use as an antidote for snake bites. *J Ethnopharmacol*, 145, n. 1, p. 220-226, 2013.
- BOLDRINI-FRANCA, J.; PINHEIRO-JUNIOR, E. L.; PEIGNEUR, S.; PUCCA, M. B. *et al.* Beyond hemostasis: a snake venom serine protease with potassium channel blocking and potential antitumor activities. *Sci Rep*, 10, n. 1, p. 4476, 2020.
- BORGES, R. J.; LEMKE, N.; FONTES, M. R. M. PLA₂-like proteins myotoxic mechanism: a dynamic model description. *Sci Rep*, 7, n. 1, p. 15514, 2017.
- BRAGA, M. D.; MARTINS, A. M.; AMORA, D. N.; DE MENEZES, D. B. *et al.* Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon*, 47, n. 8, p. 859-867, 2006.
- BRYAN-QUIROS, W.; FERNANDEZ, J.; GUTIERREZ, J. M.; LEWIN, M. R. *et al.* Neutralizing properties of LY315920 toward snake venom group I and II myotoxic phospholipases A₂. *Toxicon*, 157, p. 1-7, 2019.

CARDOSO, F. F.; SALVADOR, G. H. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; DAL-PAI, M.; FONTES, M. R. M. BthTX-I, a phospholipase A₂-like toxin, is inhibited by the plant cinnamic acid derivative: chlorogenic acid. *Biochim Biophys Acta Proteins Proteom*, 2024.

CARDOSO, F. F.; GOMES, A. A. S.; DREYER, T. R.; CAVALCANTE, W. L. G.; DAL-PAI, M.; GALLACCI, M.; FONTES, M. R. M. Neutralization of a bothropic PLA₂-like protein by caftaric acid, a novel potent inhibitor of ophidian myotoxicity. *Biochimie*, 170, p. 163-172, 2020.

CARDOSO, F. F.; BORGES, R. J.; DREYER, T. R.; SALVADOR, G. H. M.; CAVALCANTE, W. L. G.; DAL-PAI, M. Structural basis of phospholipase A₂-like myotoxin inhibition by chicoric acid, a novel potent inhibitor of ophidian toxins. *Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects*, 1862, n. 12, p. 2728-2737, 2018.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F.; WEN, F. H.; MALAQUE, C. M. S. *et al.* Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier, 2009. 6-21 p.

CHOWDHURY, A.; LEWIN, M. R.; CARTER, R.; SORIA, R. *et al.* Extreme Procoagulant Potency in Human Plasma of Venoms from the African Viperid Genera *Atheris*, *Cerastes*, and *Proatheris* and the Relative Efficacy of Antivenoms and Synthetic Enzyme-Inhibitors. *Toxins (Basel)*, 14, n. 12, 2022.

CUMPSTEY, I.; SUNDIN, A.; LEFFLER, H.; NILSSON, U. J. C₂-symmetrical thiodigalactoside bis-benzamido derivatives as high-affinity inhibitors of galectin-3: efficient lectin inhibition through double arginine-arene interactions. *Angew Chem Int Ed Engl*, 44, n. 32, p. 5110-5112, 2005.

DALLAKYAN, S.; OLSON, A. J. Small-molecule library screening by *docking* with PyRx. *Methods Mol Biol*, 1263, p. 243-250, 2015.

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

DE SOUZA, L. L.; STRANSKY, S.; GUERRA-DUARTE, C.; FLOR-SA, A. *et al.* Determination of Toxic Activities in *Bothrops* spp. Snake Venoms Using Animal-Free Approaches: Correlation Between In Vitro Versus In Vivo Assays. *Toxicol Sci.*, 147, n. 2, p. 458-65, 2015.

DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y. H.; MAGRIOTI, V. *et al.* Phospholipase A₂ enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. *Chem Rev*, 111, n. 10, p. 6130-6185, 2011.

DESHIMARU, M.; OGAWA, T.; NAKASHIMA, K.; NOBUHISA, I. *et al.* Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett*, 397, n. 1, p. 83-88, 1996.

DEY, A.; HAZRA, A. K.; MUKHERJEE, A.; NANDY, S. *et al.* Chemotaxonomy of the ethnic antidote *Aristolochia indica* for aristolochic acid content: Implications of anti-phospholipase activity and genotoxicity study. *J Ethnopharmacol*, 266, p. 113416, 2021.

DOS SANTOS, R. V.; GRILLO, G.; FONSECA, H.; STANISIC, D. *et al.* Hesperetin as an inhibitor of the snake venom serine protease from *Bothrops jararaca*. *Toxicon*, 198, p. 64-72, 2021.

- DOS SANTOS, R. V.; VILLALTA-ROMERO, F.; STANISIC, D.; BORRO, L. *et al.* Citrus bioflavonoid, hesperetin, as inhibitor of two thrombin-like snake venom serine proteases isolated from *Crotalus simus*. *Toxicon*, 143, p. 36-43, 2018.
- DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. *Toxicon*, 40, n. 6, p. 659-665, 2002.
- EFSA, E. F. S. A. Flavouring Group Evaluation 32 (FGE.32): Flavonoids (Flavanones and dihydrochalcones) from chemical groups 25 and 30. *EFSA Journal*, 8(9), n. 1065, p. 1-61, 2010.
- EL HAKIM, A. E.; SALAMA, W. H.; HAMED, M. B.; ALI, A. A. *et al.* Heterodimeric L-amino acid oxidase enzymes from Egyptian *Cerastes cerastes* venom: Purification, biochemical characterization and partial amino acid sequencing. *J Genet Eng Biotechnol*, 13, n. 2, p. 165-176, 2015.
- ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIERREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. *J Proteomics*, 74, n. 9, p. 1781-1794, 2011.
- FAHRNEY, D. E.; GOLD, A. M. Sulfonyl Fluorides as Inhibitors of Esterases. I. Rates of Reaction with Acetylcholinesterase, α -Chymotrypsin, and Trypsin. *J. Am. Chem. Soc.*, 85, n. 7, p. 997-1000, 1963.
- 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*, 1844, n. 12, p. 2265-2276, 2014.
- FERNANDES, C. A.; COMPARETTI, E. J.; BORGES, R. J.; HUANCAHUIRE-VEGA, S. *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*, 1834, n. 12, p. 2772-2781, 2013.
- FERNANDES, C. A.; MARCHI-SALVADOR, D. P.; SALVADOR, G. M.; SILVA, M. C. *et al.* Comparison between apo and complexed structures of *Bothropstoxin-I* reveals the role of Lys122 and Ca(2+)-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA₂s. *J Struct Biol*, 171, n. 1, p. 31-43, 2010.
- FERNANDES, R. S.; ASSAFIM, M.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A. *et al.* Suramin counteracts the haemostatic disturbances produced by *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*, 49, n. 7, p. 931-938, 2007.
- FERRAZ, C. R.; ARRAHMAN, A.; XIE, C. F.; CASEWELL, N. R. *et al.* Multifunctional Toxins in Snake Venoms and Therapeutic Implications: From Pain to Hemorrhage and Necrosis. *Frontiers in Ecology and Evolution*, 7, 2019.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45, n. 8, p. 969-985, 2005.
- GONZALEZ, R., II; FRANCISCO, A. F.; MOREIRA-DILL, L. S.; QUINTERO, A. *et al.* Isolation and structural characterization of bioactive compound from *Aristolochia sprucei* aqueous extract with anti-myotoxic activity. *Toxicon X*, 7, p. 100049, 2020.
- GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q. *et al.* Past decade study of snake venom L-amino acid oxidase. *Toxicon*, 60, n. 3, p. 302-311, 2012.

- GUTIERREZ, J. M.; BURNOUF, T.; HARRISON, R. A.; CALVETE, J. J. *et al.* A multicomponent strategy to improve the availability of antivenom for treating snakebite envenoming. *Bull World Health Organ*, 92, n. 7, p. 526-532, 2014.
- GUTIERREZ, J. M.; CALVETE, J. J.; HABIB, A. G.; HARRISON, R. A. *et al.* Snakebite envenoming. *Nat Rev Dis Primers*, 3, p. 17063, 2017a.
- GUTIERREZ, J. M.; LEON, G.; BURNOUF, T. Antivenoms for the treatment of snakebite envenomings: the road ahead. *Biologicals*, 39, n. 3, p. 129-142, 2011.
- GUTIERREZ, J. M.; LEON, G.; ROJAS, G.; LOMONTE, B. *et al.* Neutralization of local tissue damage induced by *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, 36, n. 11, p. 1529-1538, 1998.
- GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B.; LEON, G.; ALAPE-GIRON, A. *et al.* Snake venomomics and antivenomics: Proteomic tools in the design and control of antivenoms for the treatment of snakebite envenoming. *J Proteomics*, 72, n. 2, p. 165-182, 2009a.
- GUTIERREZ, J. M.; OWNBY, C. L. Skeletal muscle degeneration induced by venom phospholipases A₂: insights into the mechanisms of local and systemic myotoxicity. *Toxicon*, 42, n. 8, p. 915-931, 2003.
- GUTIERREZ, J. M.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A₂: comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA₂ homologue. *Toxicon*, 51, n. 1, p. 80-92, 2008.
- GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; CHAVES, F.; DIAZ, C. *et al.* Experimental pathology of local tissue damage induced by *Bothrops asper* snake venom. *Toxicon*, 54, n. 7, p. 958-975, 2009b.
- GUTIERREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DIAZ, C. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45, n. 8, p. 997-1011, 2005.
- GUTIERREZ, J. M.; SOLANO, G.; PLA, D.; HERRERA, M. *et al.* Preclinical Evaluation of the Efficacy of Antivenoms for Snakebite Envenoming: State-of-the-Art and Challenges Ahead. *Toxins (Basel)*, 9, n. 5, 2017b.
- GUTIERREZ, J. M.; TSAI, W. C.; PLA, D.; SOLANO, G. *et al.* Preclinical assessment of a polyspecific antivenom against the venoms of *Cerrophidion sasai*, *Porthidium nasutum* and *Porthidium ophryomegas*: Insights from combined antivenomics and neutralization assays. *Toxicon*, 64, p. 60-69, 2013.
- HAMAKO, J.; SUZUKI, Y.; HAYASHI, N.; KIMURA, M. *et al.* Amino acid sequence and characterization of C-type lectin purified from the snake venom of *Crotalus ruber*. *Comp Biochem Physiol B Biochem Mol Biol*, 146, n. 3, p. 299-306, 2007.
- HARRIS, J. B.; CULLEN, M. J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. *Electron Microsc Rev*, 3, n. 2, p. 183-211, 1990.
- HAVT, A.; TOYAMA, M. H.; DO NASCIMENTO, N. R.; TOYAMA, D. O. *et al.* A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *Int J Biochem Cell Biol*, 37, n. 1, p. 130-141, 2005.
- HIROTSU, S.; MIZUNO, H.; FUKUDA, K.; QI, M. C. *et al.* Crystal structure of bitiscetin, a von Willebrand factor-dependent platelet aggregation inducer. *Biochemistry*, 40, n. 45, p. 13592-13597, 2001.

HOLLAND, D. R.; CLANCY, L. L.; MUCHMORE, S. W.; RYDE, T. J. *et al.* The crystal structure of a lysine 49 phospholipase A2 from the venom of the cottonmouth snake at 2.0-Å resolution. *J Biol Chem*, 265, n. 29, p. 17649-17656, 1990.

HUANG, J.; MACKERELL, A. D., JR. CHARMM36 all-atom additive protein force field: validation based on comparison to NMR data. *J Comput Chem*, 34, n. 25, p. 2135-2145, 2013.

ITO, K.; SCOTT, S. A.; CUTLER, S.; DONG, L. F. *et al.* Thiodigalactoside inhibits murine cancers by concurrently blocking effects of galectin-1 on immune dysregulation, angiogenesis and protection against oxidative stress. *Angiogenesis*, 14, n. 3, p. 293-307, 2011.

JERABEK-WILLEMSSEN, M.; WIENKEN, C.J.; BRAUN, D.; BAASKE, P.; DUHR, S. Molecular interaction studies using microscale thermophoresis. *Assay Drug Dev Technol.*, 9, n. 4, p. 342-53, 2011.

JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B. *et al.* Inhibition of platelet aggregation by the recombinant cysteine-rich domain of the hemorrhagic snake venom metalloproteinase, atrolysin A. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 373, n. 1, p. 281-286, 2000.

JO, S.; KIM, T.; IYER, V. G.; IM, W. CHARMM-GUI: a web-based graphical user interface for CHARMM. *J Comput Chem*, 29, n. 11, p. 1859-1865, 2008.

JORDAN, S. A.; PERWAIZ, S. Aristolochic Acids. In: WEXLER, P. (Ed.). *Encyclopedia of Toxicology 3ed.*: Academic Press, 2014. p. 298-301.

KAMIGUTI, A. S.; GALLAGHER, P.; MARCINKIEWICZ, C.; THEAKSTON, R. D. *et al.* Identification of sites in the cysteine-rich domain of the class P-III snake venom metalloproteinases responsible for inhibition of platelet function. *FEBS Lett*, 549, n. 1-3, p. 129-134, 2003.

KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A. R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N. K. *et al.* The global burden of snakebite: a literature analysis and modelling based on regional estimates of envenoming and deaths. *PLoS Med*, 5, n. 11, p. e218, 2008.

LALLOO, D. G.; THEAKSTON, R. D. Snake antivenoms. *J Toxicol Clin Toxicol*, 41, n. 3, p. 277-290; 317-227, 2003.

LAYFIELD, H. J.; WILLIAMS, H. F.; RAVISHANKAR, D.; MEHMI, A. *et al.* Repurposing Cancer Drugs Batimastat and Marimastat to Inhibit the Activity of a Group I Metalloprotease from the Venom of the Western Diamondback Rattlesnake, *Crotalus atrox*. *Toxins (Basel)*, 12, n. 5, 2020.

LEFFLER, H.; BARONDES, S. H. Specificity of binding of three soluble rat lung lectins to substituted and unsubstituted mammalian beta-galactosides. *J Biol Chem*, 261, n. 22, p. 10119-10126, 1986.

LEWIN, M. R.; CARTER, R. W.; MATTEO, I. A.; SAMUEL, S. P. *et al.* Varespladib in the Treatment of Snakebite Envenoming: Development History and Preclinical Evidence Supporting Advancement to Clinical Trials in Patients Bitten by Venomous Snakes. *Toxins (Basel)*, 14, n. 11, 2022.

LIMA, M. E. P., A. M. C.; MARTIN-EAUCLAIRE, M. F.; ZINGALI, R. B.; ROCHAT, H. Animal toxins: state of the art - perspectives in health and biotechnology. *J. venom. anim. toxins incl. trop. dis* 15, n. 3, p. 585-586, 2009.

- LIN-SHIAU, S. Y.; LIN, M. J. Suramin inhibits the toxic effects of presynaptic neurotoxins at the mouse motor nerve terminals. *Eur J Pharmacol*, 382, n. 2, p. 75-80, 1999.
- LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; CALDERON, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon*, 42, n. 8, p. 885-901, 2003.
- LOMONTE, B., ANGULO, Y., RUFINI, S., CHO, W., GIGLIO, J.R., OHNO, M., DANIELE, J.J., GEOGHEGAN, P., GUTIERREZ, J.M. Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon*, 37, p. 145-158, 1999.
- LU, Q.; NAVDAEV, A.; CLEMETSON, J. M.; CLEMETSON, K. J. Snake venom C-type lectins interacting with platelet receptors. Structure-function relationships and effects on haemostasis. *Toxicon*, 45, n. 8, p. 1089-1098, 2005.
- MACHADO, A. R. T.; AISSA, A. F.; RIBEIRO, D. L.; COSTA, T. R. *et al.* Cytotoxic, genotoxic, and oxidative stress-inducing effect of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararacussu* venom in a co-culture model of HepG2 and HUVEC cells. *Int J Biol Macromol*, 127, p. 425-432, 2019.
- MAMEDE, C. C. N.; DE SOUSA SIMAMOTO, B. B.; DA CUNHA PEREIRA, D. F.; DE OLIVEIRA COSTA, J. *et al.* Edema, hyperalgesia and myonecrosis induced by Brazilian bothropic venoms: overview of the last decade. *Toxicon*, 187, p. 10-18, 2020.
- MAMEDE, C. C. N.; DE SOUSA SIMAMOTO, B. B.; PEREIRA, D. F.; MATIAS, M. S. *et al.* Comparative analysis of local effects caused by *Bothrops alternatus* and *Bothrops moojeni* snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. *Toxicon*, 117, p. 47-45, 2016.
- MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochim Biophys Acta*, 1477, n. 1-2, p. 146-156, 2000.
- MATSUSHITA, T.; MEYER, D.; SADLER, J. E. Localization of von willebrand factor-binding sites for platelet glycoprotein Ib and botrocetin by charged-to-alanine scanning mutagenesis. *J Biol Chem*, 275, n. 15, p. 11044-11049, 2000.
- MIZUNO, H.; FUJIMOTO, Z.; ATODA, H.; MORITA, T. Crystal structure of an anticoagulant protein in complex with the Gla domain of factor X. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 98, n. 13, p. 7230-7234, 2001.
- MONTEIRO, R. Q.; ZINGALI, R. B. Inhibition of prothrombin activation by bothrojaracin, a C-type lectin from *Bothrops jararaca* venom. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 382, n. 1, p. 123-128, 2000.
- MORA-OBANDO, D., DIAZ, C., ANGULO, Y., GUTIERREZ, J.M., LOMONTE, B. Role of enzymatic activity in muscle damage and cytotoxicity induced by *Bothrops asper* Asp49 phospholipase A2 myotoxins: are there additional effector mechanisms involved? *PeerJ*, 2, 569, 2014a.
- MORA-OBANDO, D.; FERNANDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIERREZ, J. M. *et al.* Synergism between basic Asp49 and Lys49 phospholipase A2 myotoxins of viperid snake venom in vitro and in vivo. *PLoS One*, 9, n. 10, p. e109846, 2014b.

- MORITA, T. Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*, 45, n. 8, p. 1099-1114, 2005.
- MUNIZ, J. R.; AMBROSIO, A. L.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S.; COMINETTI, M. R. *et al.* The three-dimensional structure of bothropasin, the main hemorrhagic factor from *Bothrops jararaca* venom: insights for a new classification of snake venom metalloprotease subgroups. *Toxicon*, 52, n. 7, p. 807-816, 2008.
- MURAKAMI, M. T.; ARRUDA, E. Z.; MELO, P. A.; MARTINEZ, A. B. *et al.* Inhibition of myotoxic activity of *Bothrops asper* myotoxin II by the anti-trypanosomal drug suramin. *Journal of Molecular Biology*, 350, n. 3, p. 416-426, 2005.
- MURAKAMI, M. T.; GABDOULKHAKOV, A.; GENOV, N.; CINTRA, A. C. *et al.* Insights into metal ion binding in phospholipases A2: ultra high-resolution crystal structures of an acidic phospholipase A2 in the Ca²⁺ free and bound states. *Biochimie*, 88, n. 5, p. 543-549, 2006.
- NASCIMENTO, N. G.; SAMPAIO, M. C.; OLIVO, R. A.; TEIXEIRA, C. Contribution of mast cells to the oedema induced by *Bothrops moojeni* snake venom and a pharmacological assessment of the inflammatory mediators involved. *Toxicon*, 55, n. 2-3, p. 343-52, 2010.
- NIELSEN, V. G. Characterization of L-amino Acid Oxidase Derived from *Crotalus adamanteus* Venom: Procoagulant and Anticoagulant Activities. *Int J Mol Sci*, 20, n. 19, 2019.
- OGAWA, T.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OHNO, M. Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon*, 45, n. 1, p. 1-14, 2005.
- OGILVIE, M. L.; BYL, J. W.; GARTNER, T. K. Platelet-aggregation is stimulated by lactose-inhibitable snake venom lectins. *Thromb Haemost*, 62, n. 2, p. 704-707, 1989.
- OHKURA, M.; MIYASHITA, Y.; NIKAI, T.; SUZUKI, J. *et al.* Properties of Ca⁺⁺ release induced by puff adder lectin, a novel lectin from the snake *Bitis arietans*, in sarcoplasmic reticulum. *J Pharmacol Exp Ther*, 277, n. 2, p. 1043-1048, 1996.
- OLIVEIRA, A. K.; PAES LEME, A. F.; ASEGA, A. F.; CAMARGO, A. C. *et al.* New insights into the structural elements involved in the skin haemorrhage induced by snake venom metalloproteinases. *Thromb Haemost*, 104, n. 3, p. 485-497, 2010.
- OLSSON, M. H.; SONDERGAARD, C. R.; ROSTKOWSKI, M.; JENSEN, J. H. PROPKA3: Consistent Treatment of Internal and Surface Residues in Empirical pKa Predictions. *J Chem Theory Comput*, 7, n. 2, p. 525-537, 2011.
- OTERO, R.; LEON, G.; GUTIERREZ, J. M.; ROJAS, G. *et al.* Efficacy and safety of two whole IgG polyvalent antivenoms, refined by caprylic acid fractionation with or without beta-propiolactone, in the treatment of *Bothrops asper* bites in Colombia. *Trans R Soc Trop Med Hyg*, 100, n. 12, p. 1173-1182, 2006.
- OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAÚJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. *Toxicon*, 37, n. 3, p. 411-445, 1999.
- OZEKI, Y.; MATSUI, T.; HAMAKO, J.; SUZUKI, M. *et al.* C-type galactoside-binding lectin from *Bothrops jararaca* venom: comparison of its structure and function with those of botrocetin. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 308, n. 1, p. 306-310, 1994.
- PANUNTO, P. C.; DA SILVA, M. A.; LINARDI, A.; BUZIN, M. P. *et al.* Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, 47, n. 1, p. 21-31, 2006.

PAWELEK, P. D.; CHEAH, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P. *et al.* The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *EMBO J*, 19, n. 16, p. 4204-4215, 2000.

PINSKY, C. D., A. K.; LABELLA, F. S. Phenylmethylsulfonyl fluoride (PMSF) given systemically produces naloxone-reversible analgesia and potentiates effects of beta-endorphin given centrally. *Life Sciences*, 31, n. 12-13, p. 1193-1196, 1982.

ROOHBAKHSH, A.; PARHIZ, H.; SOLTANI, F.; REZAEI, R. *et al.* Molecular mechanisms behind the biological effects of hesperidin and hesperetin for the prevention of cancer and cardiovascular diseases. *Life Sci*, 124, p. 64-74, 2015.

SALVADOR, G. H.; DOS SANTOS, J. I.; LOMONTE, B.; FONTES, M. R. Crystal structure of a phospholipase A(2) from *Bothrops asper* venom: Insights into a new putative "myotoxic cluster". *Biochimie*, 133, p. 95-102, 2017.

SALVADOR, G. H.; DREYER, T. R.; CAVALCANTE, W. L.; MATIOLI, F. F. *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 Crystallogr D Biol Crystallogr*, 71, n. Pt 10, p. 2066-2078, 2015.

SALVADOR, G. H. M.; BORGES, R. J.; EULALIO, M. M. C.; DOS SANTOS, L. D. *et al.* Biochemical, pharmacological and structural characterization of BmooMP-I, a new P-I metalloproteinase from *Bothrops moojeni* venom. *Biochimie*, 179, p. 54-64, 2020.

SALVADOR, G. H. M.; DREYER, T. R.; GOMES, A. A. S.; CAVALCANTE, W. L. G. *et al.* Structural and functional characterization of suramin-bound MjTX-I from *Bothrops moojeni* suggests a particular myotoxic mechanism. *Sci Rep*, 8, n. 1, p. 10317, 2018.

SALVADOR, G. H. M.; GOMES, A. A. S.; BRYAN-QUIROS, W.; FERNANDEZ, J. *et al.* Structural basis for phospholipase A(2)-like toxin inhibition by the synthetic compound Varespladib (LY315920). *Sci Rep*, 9, n. 1, p. 17203, 2019.

SALVADOR, G. H.M.; PINTO, Ê. K. R.; ORTOLANI, P. L.; FORTES-DIAS, C. L.; CAVALCANTE, W. L. G; SOARES, A. M.; LOMONTE, B.; LEWIN, M. R.; FONTES M. R. M. Structural basis of the myotoxic inhibition of the *Bothrops pirajai* PrTX-I by the synthetic varespladib. *Biochimie*, 207, p. 1-10, 2023.

SAMPAT, G.H., HIREMATH, K., DODAKALLANAVAR, J. *et al.* Unraveling snake venom phospholipase A₂: an overview of its structure, pharmacology, and inhibitors. *Pharmacol. Rep*, 75, p. 1454–1473, 2023.

SANT'ANA, C. D.; TICLI, F. K.; OLIVEIRA, L. L.; GIGLIO, J. R. *et al.* BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol*, 151, n. 3, p. 443-454, 2008.

SARTIM, M. A.; PINHEIRO, M. P.; DE PADUA, R. A. P.; SAMPAIO, S. V. *et al.* Structural and binding studies of a C-type galactose-binding lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Toxicon*, 126, p. 59-69, 2017.

SCHEUERMANN, T. H.; PADRICK, S. B.; GARDNER, K. H.; BRAUTIGAM, C. A. On the acquisition and analysis of microscale thermophoresis data. *Analytical Biochemistry*, 496, P. 79-93, 2016.

SEN, U.; VASUDEVAN, S.; SUBBARAO, G.; MCCLINTOCK, R. A. *et al.* Crystal structure of the von Willebrand factor modulator botrocetin. *Biochemistry*, 40, n. 2, p. 345-352, 2001.

SERRANO, S. M.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon*, 45, n. 8, p. 1115-1132, 2005.

SHARMA, M.; AKHTAR, N.; SAMBHAV, K.; SHETE, G. *et al.* Emerging potential of citrus flavanones as an antioxidant in diabetes and its complications. *Curr Top Med Chem*, 15, n. 2, p. 187-195, 2015.

SHIKAMOTO, Y.; MORITA, T.; FUJIMOTO, Z.; MIZUNO, H. Crystal structure of Mg²⁺- and Ca²⁺-bound Gla domain of factor IX complexed with binding protein. *J Biol Chem*, 278, n. 26, p. 24090-24094, 2003.

SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., HOMSI-BRANDEBURGO, M.I., TOYAMA, M.H., LOMBARDI, F.R., ARNI, R.K., GIGLIO, J.R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. *Toxicon*, 36, p. 503-514, 1998.

SOUZA, D. H.; EUGENIO, L. M.; FLETCHER, J. E.; JIANG, M. S. *et al.* Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Archives of Biochemistry and Biophysics*, 368, n. 2, p. 285-290, 1999.

STEWART, W. P.; THOMAS, A. L. Marimastat: the clinical development of a matrix metalloproteinase inhibitor. *Expert Opin Investig Drugs*, 9, n. 12, p. 2913-2922, 2000.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S. Snake venom metalloproteinases: structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. *Biochim Biophys Acta*, 1824, n. 1, p. 164-176, 2012.

TONN, J. C.; KERKAU, S.; HANKE, A.; BOUTERFA, H. *et al.* Effect of synthetic matrix-metalloproteinase inhibitors on invasive capacity and proliferation of human malignant gliomas in vitro. *Int J Cancer*, 80, n. 5, p. 764-772, Mar 1 1999.

ULLAH, A.; MASOOD, R.; ALI, I.; ULLAH, K. *et al.* Thrombin-like enzymes from snake venom: Structural characterization and mechanism of action. *Int J Biol Macromol*, 114, p. 788-811, 2018.

ULLAH, A.; SOUZA, T. A.; ABREGO, J. R.; BETZEL, C. *et al.* Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. *Biochem Biophys Res Commun*, 421, n. 1, p. 124-128, 2012.

ULLAH, A.; SOUZA, T. A.; ZANPHORLIN, L. M.; MARIUTTI, R. B. *et al.* Crystal structure of Jararacussin-I: the highly negatively charged catalytic interface contributes to macromolecular selectivity in snake venom thrombin-like enzymes. *Protein Sci*, 22, n. 1, p. 128-132, 2013.

VIVAS-RUIZ, D. E.; ROSAS, P.; PROLEON, A.; TORREJON, D. *et al.* Pictolysin-III, a Hemorrhagic Type-III Metalloproteinase Isolated from *Bothrops pictus* (Serpentes: Viperidae) Venom, Reduces Mitochondrial Respiration and Induces Cytokine Secretion in Epithelial and Stromal Cell Lines. *Pharmaceutics*, 15, n. 5, 2023.

WALKER, J. R.; NAGAR, B.; YOUNG, N. M.; HIRAMA, T. *et al.* X-ray crystal structure of a galactose-specific C-type lectin possessing a novel decameric quaternary structure. *Biochemistry*, 43, n. 13, p. 3783-3792, 2004.

- WALLNOEFER, H. G.; LINGOTT, T.; GUTIERREZ, J. M.; MERFORT, I. *et al.* Backbone flexibility controls the activity and specificity of a protein-protein interface: specificity in snake venom metalloproteases. *J Am Chem Soc*, 132, n. 30, p. 10330-10337, 2010.
- WARRELL, D. A. Snake bite. *Lancet*, 375, n. 9708, p. 77-88, 2010.
- WHITTAKER, M.; FLOYD, C. D.; BROWN, P.; GEARING, A. J. Design and therapeutic application of matrix metalloproteinase inhibitors. *Chem Rev*, 99, n. 9, p. 2735-2776, 1999.
- WHO. Snakebite envenoming. 2018.
- WIEDEMAR, N.; HAUSER, D. A.; MASER, P. 100 Years of Suramin. *Antimicrob Agents Chemother*, 64, n. 3, 2020.
- WIEZEL, G. A.; BORDON, K. C.; SILVA, R. R.; GOMES, M. S. *et al.* Subproteome of *Lachesis muta rhombeata* venom and preliminary studies on LmrSP-4, a novel snake venom serine proteinase. *J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis*, 25, p. e147018, 2019.
- WILLIAMS, D. J.; FAIZ, M. A.; ABELA-RIDDER, B.; AINSWORTH, S. *et al.* Strategy for a globally coordinated response to a priority neglected tropical disease: Snakebite envenoming. *PLoS Negl Trop Dis*, 13, n. 2, p. e0007059, 2019.
- XIE, Z.; YANG, C.; XU, T. Hesperetin attenuates LPS-induced the inflammatory response and apoptosis of H9c2 by activating the AMPK/P53 signaling pathway. *Immun Inflamm Dis*, 11, n. 8, p. e973, 2023.
- XIMENES, R. M.; ALVES, R. S.; PEREIRA, T. P.; ARAUJO, R. M. *et al.* Harpalycin 2 inhibits the enzymatic and platelet aggregation activities of PrTX-III, a D49 phospholipase A2 from *Bothrops pirajai* venom. *BMC Complement Altern Med*, 12, p. 139, 2012.
- ZAQUEO, K. D.; KAYANO, A. M.; SIMOES-SILVA, R.; MOREIRA-DILL, L. S. *et al.* Isolation and biochemical characterization of a new thrombin-like serine protease from *Bothrops pirajai* snake venom. *Biomed Res Int*, 2014, p. 595186, 2014.
- ZYCHAR, B. C.; DALE, C. S.; DEMARCHI, D. S.; GONCALVES, L. R. Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. *Toxicon*, 55, n. 2-3, p. 227-34, 2010.