

MARIA INÁCIA ESTEVÃO COSTA

**Prospecção dos inibidores de fosfolipases A₂ das classes alfa e
gama (α PLI e γ PLI) endógenos no plasma de serpentes
Crotalidae brasileiras: caracterização molecular
e propriedades biológicas**

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas gerais
2008**

Maria Inácia Estevão Costa

**Prospecção dos inibidores de fosfolipase A₂ das classes alfa e
gama (α PLI e γ PLI) endógenos no plasma de serpentes
Crotalidae brasileiras: caracterização molecular
e propriedades biológicas**

**Orientação: Dra. Glória Regina Franco
Dra. Consuelo Latorre Fortes Dias**

**Tese apresentada ao Departamento de
Bioquímica e Imunologia do Instituto de
Ciências Biológicas (UFMG) como requisito
parcial para a obtenção do título de Doutor em
Bioquímica e Imunologia.**


**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas gerais
2008**



Universidade Federal de Minas Gerais -
 Curso de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia ICB/UFMG
 Av. Antônio Carlos, 6627 – Pampulha
 31270-901 – Belo Horizonte – MG
 e-mail: pg-biq@icb.ufmg.br (31)3499-2615




ATA DA DEFESA DA TESE DE DOUTORADO DE MARIA INÁCIA ESTEVÃO COSTA. Aos oito dias do mês de setembro de 2008 às 13:00 horas, reuniu-se no Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais a Comissão Examinadora da tese de doutorado, indicada *ad referendum* do Colegiado do Curso, para julgar, em exame final, o trabalho intitulado “Prospecção dos inibidores de fosfolipase A2 das classes alfa e gama (α PLI e γ PLI) endógenos no plasma de serpentes Crotalinae brasileiras: caracterização molecular e propriedades biológicas”, requisito final para a obtenção do grau de Doutor em Ciências: Bioquímica. Abrindo a sessão a Presidente da Comissão, Dra. Glória Regina Franco, da Universidade Federal de Minas Gerais, após dar a conhecer aos presentes o teor das Normas Regulamentares do Trabalho Final, passou a palavra a candidata para apresentação de seu trabalho. Seguiu-se a arguição pelos examinadores, com a respectiva defesa da candidata. Logo após a Comissão se reuniu, sem a presença da candidata e do público, para julgamento e expedição do resultado final. Foram atribuídas as seguintes indicações: Dr. Jonas Enrique Aguilar Perales da Fundação Oswaldo Cruz, aprovada; Dra. Marta do Nascimento Cordeiro da Fundação Ezequiel Dias, aprovada; Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dr. Carlos Renato Machado da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada; Dra. Consuelo Latorre Fortes Dias, co-orientadora, da Fundação Ezequiel Dias, aprovada; Dra. Glória Regina Franco, orientadora, da Universidade Federal de Minas Gerais, aprovada. Pelas indicações a candidata foi considerada APROVADA. O resultado final foi comunicado publicamente a candidata pela Presidente da Comissão. Nada mais havendo a tratar a Presidente da Comissão encerrou a reunião e lavrou a presente Ata que será assinada por todos os membros participantes da Comissão Examinadora. Belo Horizonte, 8 de setembro de 2008.

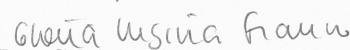

 Dr. Jonas Enrique Aguilar Perales – Fiocruz - RJ



 Dra. Marta do Nascimento Cordeiro – FUNED


 Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia – UFMG


 Dr. Carlos Renato Machado – UFMG


 Dra. Consuelo Latorre Fortes Dias / Co-orientadora – FUNED


 Dra. Glória Regina Franco / Orientadora - UFMG


 Profa. Andréa Mara Macedo
 Coordenadora do Curso de Pós - Graduação em
 Bioquímica e Imunologia
 Instituto de Ciências Biológicas - UFMG

Maria Inácia Estevão Costa

Prospecção dos inibidores de fosfolipase A₂ das classes alfa e gama (α PLI e γ PLI) endógenos no plasma de serpentes Crotalidae brasileiras: caracterização molécula e propriedades biológicas

Locais de Execução:

Laboratório de Biologia Molecular-Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento – FUNED e Departamento de Bioquímica e Imunologia – LGB/ ICB – UFMG

Órgãos Financiadores:

Conselho Nacional de desenvolvimento e Pesquisa (CNPq)
Fundação de Amparo à pesquisa de minas Gerais (FAPEMIG)
Fundação Ezequiel Dias (FUNED)

**Belo Horizonte
Instituto de Ciências Biológicas
Universidade Federal de Minas gerais
2008**

*“ Às vezes parecia
Que de tanto acreditar
Em tudo que achávamos
Tão certo...*

*Teríamos o mundo inteiro
E até um pouco mais
Fariamos floresta do
deserto
E diamantes de pedaços
De vidro...”*

*Composição: Dado Villa-
Lobos; Renato Russo e
Marcelo Bonfá*

AGRADECIMENTOS

Agradeço...

À Professora Dra. Glória Regina Franco pela orientação, paciência e confiança inestimáveis durante a realização deste trabalho.

À minha orientadora Dra. Consuelo L. Fortes Dias, pela oportunidade de realizar este trabalho e por incentivar meu desenvolvimento profissional. Agradeço ainda pela confiança de permitir que durante o desenvolvimento deste trabalho na bancada, eu pudesse escolher os caminhos a seguir.

Ao colega Maurício A. Mudado, agradeço a amizade e a boa vontade com que se empenhou me “salvar” nas imprescindíveis análises de bioinformática.

Ao Dr. Rodrigo Redondo pela valiosa colaboração nos estudos filogenéticos com inibidores da classe gama.

À Gisele Agostini Cotta e ao Ricardo Maciel do Serviço de Animais Peçonhentos da Funed, por me ajudarem na identificação das serpentes e coleta dos órgãos.

Aos professores Santuza Teixeira, Maria Elena de Lima e Paulo Sérgio Beirão pelas valiosas críticas e sugestões quando da avaliação do projeto no Exame de Qualificação, o que me incentivou a realizar um trabalho melhor. Obrigada...

À amiga Ana Valentim pela excelente assistência técnica nos experimentos de purificação de proteínas sempre com um sorriso grande para nos ajudar

À amiga Regina, secretária da DCB, pela solidariedade e bondade com que sempre me ajudou em todos estes anos de convivência.

Às amigas do laboratório Alice, Mariana e Paula. Sem a ajuda de vocês tudo seria mais difícil...

Aos muitos estudantes de iniciação científica e estagiários que passaram pelo laboratório. Todos foram muito importantes no meu aprendizado e crescimento pessoal e profissional. Citarei apenas os mais recentes, mas o carinho por todos é o mesmo: Aristeu Neto, Bruno Rocha, Danilo Mudado, Douglas Messeder, Eduardo Assis, Flaviane Moraes, Priscila Schaffert, Rafaella Avelar, Rebeca Lima e Soraya Saliba.

Aos vários amigos da Divisão de Ciências Biomédicas e Divisão de Ciências Farmacêuticas pelo convívio, carinho e boas risadas: Dário, Eládio, Édina, Cláudia Gontijo, Gorette, Luciana, Márcia, Márcia Helena, Marcelo Diniz, Marta, Mike, Renato, Roberta e Patrícia Cota.

À Jovita Gazzineli por disponibilizar seus equipamentos sempre que necessário. Mais que isto, me incentivando sempre...

Aos meus amigos e colegas da Funed pelo incentivo, convívio e carinho que tanto contribuíram para a realização deste doutorado: Sandra, Kioko, Ana Maria, Adriane Zacarias, Simone Calich, Raquel Joane, o “pessoal” da comunicação e da informática (Rodrigo Cardoso, Fábio, Marlon Damasceno, Vinícius, Fabiano “Rudy”, Marina e Breno).

Ao João Maciel pela ajuda na revisão do texto.

Ao meu pai, minhas irmãs e ao Alexandre

À minha mãe saudade eterna

RESUMO

A presença de inibidores plasmáticos de fosfolipase A₂ (PLA₂) no plasma de serpentes tem sido relatada por vários pesquisadores. Estes inibidores atualmente são classificados em três classes: alfa, beta e gama, de acordo com sua estrutura (Ohkura e cols., 1997). Inibidores alfa apresentam domínios semelhantes ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) das lectinas tipo-C, enquanto inibidores da classe gama apresentam em sua estrutura, repetições ricas em leucina (LRR), como a α 2-macroglobulina humana. Já a classe gama mostram um padrão de resíduos cisteína similar ao do receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (u-PAR). Neste trabalho investigamos a presença de cDNAs codificadores de inibidores de PLA₂ (PLIs) das classes alfa e gama no fígado de seis espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*), além de *Lachesis muta muta* e *Crotalus durissus terrificus*. Os cDNAs foram obtidos por RT-PCR a partir do RNA total do fígado de cada espécime. A amplificação do DNA foi realizada por PCR na presença de oligonucleotídeos desenhados com base na sequência de nucleotídeos publicados na literatura (inibidor alfa de *Agkistrodon blomhoffii siniticus* e no inibidor gama de *C. d. terrificus*). Os produtos de amplificação foram clonados em vetores do tipo TA e colônias recombinantes positivas foram confirmadas por PCR. Os DNAs de pelo menos quatro clones positivos para cada inibidor alfa e dois clones para cada inibidor gama foram completamente sequenciados. As sequências nucleotídicas, assim como as estruturas primárias deduzidas foram alinhadas com sequências de inibidores conhecidos para pesquisa de homologia. Utilizando ferramentas de bioinformática foram realizadas análises detalhadas para cada proteína. Foram derivadas árvores filogenéticas para cada classe de PLIs brasileiros descritos, assim como a sugestão de modelos tridimensionais. A expressão de uma proteína recombinante da classe alfa foi realizada com sucesso em sistema de expressão procariota.

ABSTRACT

The presence of phospholipase A₂ (PLA₂) inhibitors in the blood plasma of snakes has been reported by several authors. These inhibitors are, presently, classified in three structural classes named alfa, beta and gamma. Alfa-inhibitors contain a domain similar to the carbohydrate recognition domain (CRD) of C-type lectins, whereas beta-inhibitors display leucine-rich repeats (LRR) such as those present in the human alpha₂-macroglobulin. In the gamma-class members, in turn, the cystein pattern resembles that found in the urokinase-type plasminogen activator receptor (u-PAR). In the present study we investigated the presence of mRNA codifying for alfa- and gamma-PLA₂ inhibitors (PLIs) in the liver tissue of six Brazilian snake species in the genus *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* and *B. neuwiedi*) besides *Lachesis muta* and *Crotalus durissus terrificus*, by RT-PCR. DNA amplification was performed in the presence of primers designed based on PLIs already published in the literature (an alpha-PLI from *Agkistrodon blomhoffii siniticus* and a gamma-PLI from *C. d. terrificus*). The amplification products were cloned in TA-kind plasmid vector and a number of putative positive clones was confirmed by PCR. The DNAs of a minimum of four and two positive clones for alfa- and gamma- PLIs, respectively, were completely sequenced. The nucleotide sequences as well as the deduced primary sequences obtained were aligned with known PLIs looking for homology. A detailed analysis of each novel PLI-homologous protein was performed using bioinformatics tools. Phylogenetic trees were derived for the alpha- and gamma-PLIs from Brazilian snakes described, so far, and the tridimensional structure of an alpha-PLI (from *L. muta*) was modelled by homology. The obtention of a representative recombinant protein alpha-PLI (in procariote) are described.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
1.1	As serpentes e seus venenos	17
1.2	Fosfolipases A ₂ (PLA ₂)	19
1.3	Inibidores naturais de PLA ₂ (PLIs)	25
2	Justificativa e relevância	30
3	OBJETIVOS	34
4	MATERIAIS	35
4.1	Reagentes em geral	35
4.2	Soluções e meios de cultura	35
4.3	Linhagens bacterianas	35
4.4	Vetores plasmidiais	35
4.5	Kits	36
4.6	Resinas Cromatográficas	36
4.7	Proteínas e enzimas	36
5	METODOLOGIA	37
5.1	Obtenção dos tecidos de serpentes	37
5.2	Isolamento de RNA total	37
5.3	Qualidade do RNA total	39
5.4	Desenho e síntese de oligonucleotídeos	39
5.5	Síntese dos cDNAs codificadores dos inibidores	40
5.6	Clonagem dos insertos	40
5.7	Preparação de células competentes	41
5.8	Transformação	42
5.9	Preparação do DNA plasmidial (miniprep)	43
5.10	Sequenciamento de DNA	44
5.11	Edição das seqüências, pesquisa de similaridade e construção de árvores filogenéticas	48
5.11.1	Edição das sequências	48
5.11.2	Pesquisa de similaridade e construção de árvores filogenéticas	50
5.11.3	Pesquisa de domínios conservados	51
5.11.4	Análise de estruturas secundárias	51
5.11.5	Análise de modificações pós-traducionais	52
5.11.6	Modelagem molecular por homologia	52

5.12	Clonagem e expressão de um α PLI em sistema procariota	53
5.12.1	Digestão enzimática do do inserto e do vetor pET-32c(+)	54
5.12.2	Purificação das amostras digeridas	56
5.12.3	Ligação vetor - inserto	56
5.12.4	Transformação bacteriana	57
5.12.5	Seleção de clones prováveis recombinantes	57
5.12.6	Expressão da proteína CdtA4- α PLI induzida	57
5.12.7	Análise da proteína recombinante por SDS-PAGE	58
5.12.8	Determinação da solubilidade da proteína recombinante	59
5.12.9	Indução de expressão protéica em maior escala	60
5.12.10	Purificação da proteína recombinante em HPLC	60
5.13	Purificação de uma PLA ₂ miotóxica do veneno de B. jararacussu	61
5.14	Purificação de α PLI recombinante em coluna de afinidade	62
5.14.1	Preparação da coluna de afinidade sepharose-BthxI	62
5.14.2	Cromatografia em coluna de afinidade sepharose-BthxI	63
6	RESULTADOS	64
6.1	Prospecção de inibidores da classe alfa	64
6.1.1	RT-PCR de amostras de tecido hepático	64
6.1.2	Detecção da presença de cDNA codificador de α PLIs	66
6.1.3	Clonagem e sequenciamento dos DNAs plasmidiais recombinantes	68
6.1.4	Análise das mutações nucleotídicas nos α PLIs	75
6.1.5	Árvore filogenética gerada para α PLIs	78
6.1.6	Análise de modificações pós-traducionais	80
6.4.7	Pesquisa de domínios conservados em α PLIs	82
6.1.8	Análise de estrutura secundária	84
6.1.9	Um modelo 3D para um α PLI	87
6.1.10	Clonagem e expressão de um α PLI recombinante	91
6.1.10.1	Preparação do DNA para clonagem	92
6.1.10.2	Seleção de clones prováveis recombinantes	93
6.1.10.3	Indução de expressão em maior escala	93
6.1.10.4	Determinação da solubilidade da proteína recombinante	95
6.1.10.5	Purificação da proteína recombinante expressa	97
6.2	Prospecção de inibidores da classe gama	102
6.2.1	RT-PCR de amostras de tecido hepático	102
6.2.2	Detecção de cDNAs codificadores de γ PLIs	102

6.2.3	Clonagem e seqüenciamento do DNA plasmidial	104
6.2.4	Análise das mutações nucleotídicas dos novos γ PLI _s	109
6.2.5	Análise filogenética para γ PLI _s	111
6.2.6	Características dos inibidores γ PLI _s	113
6.2.7	Análises de modificações pós-traducionais	113
6.2.8	Análises de estruturas secundárias	115
6.2.9	Pesquisa de domínios conservados	117
6.2.10	Um modelo 3D para o inibidor γ PLI	119
7	DISCUSSÃO	122
7.1	Inibidores alfa (α PLI _s)	122
7.2	Inibidores gama (γ PLI _s)	128
7.3	As fosfolipases A ₂ e os inibidores das classes alfa e gama	131
8	CONCLUSÕES	138
9	PERSPECTIVAS	139
10	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	140
11	PRODUÇÕES BIBLIOGRÁFICAS DURANTE O PERÍODO	155

LISTA DE FIGURAS

01	Distribuição mundial das serpentes peçonhentas	18
02	Frequência de mutação de resíduos nas sPLA ₂ de serpentes	24
03	Classes estruturais de inibidores de PLA ₂	27
04	Edição das seqüências dos inibidores	49
05	O vetor pET 32c(+)	55
06	Avaliação da integridade do RNA	65
07	Síntese da primeira fita do cDNA codificador do inibidor α PLI	67
08	Alinhamento múltiplo de nucleotídeos codificadores dos α PLI	69
09	Alinhamento múltiplo das estruturas primárias deduzidas para α PLI	73
10	Representação gráfica das mutações nos α PLI	77
11	Árvore filogenética gerada para inibidores α PLI	79
12	Domínios conservados nas estruturas dos α PLI	83
13	Predição de estrutura secundária para α PLI	85
14	Estrutura 3D sugerida para inibidores alfa	88
15	Plot de Ramachandran para o modelo 3D do α PLI	89
16	Comparação do modelo 3D de Lm03- α PLI com proteínas similares	90
17	Amplificação do DNA para expressão de α PLIs recombinante	92
18	Expressão da proteína Cdt- α PLI recombinante	94
19	Determinação da solubilidade da proteína Cdt- α PLI recombinante	96
20	Perfil cromatográfico da purificação da proteína Cdt- α PLI recombinante	98
21	Etapas cromatográficas para purificação da PLA ₂ bothropstoxina I	100
22	Purificação da proteína Cdt- α PLI recombinante em coluna de afinidade	101
23	Síntese da primeira fita dos cDNAs codificadores dos inibidores gama de PLA ₂	103
24	Alinhamento múltiplo das seqüências nucleotídicas dos γ PLIs	106
25	Alinhamento múltiplo das seqüências de aminoácidos deduzidas dos γ PLIs	108
26	Representação gráfica das mutações nos γ PLIs	110
27	Árvore filogenética Bayesiana dos γ PLIs	112
28	Predição de estrutura secundária para γ PLIs	116
29	Domínios conservados nas estruturas dos γ PLIs	118
30	Modelo 3D para γ PLIs	120
31	Plot de Ramachandran para o modelo 3D do inibidor gama	121

LISTA DE TABELAS

01	Principais grupos de fosfolipases A ₂ secretórias	21
02	Inibidores alfa já purificados do plasma de serpentes	29
03	Nucleotídeos mais mutados em inibidores alfa	76
04	Sítios de fosforilação preditos para inibidores alfa	81
05	Número e tipo de mutações em nucleotídeos dos inibidores alfa	110
06	Sítios de fosforilação preditos para inibidores gama	114
07	PLIs endógenos purificados do plasma de serpentes venenosas e não venenosas	135

LISTA DE ABREVIATURAS

α PLI	Inibidor de fosfolipase A ₂ da classe alfa
β PLI	Inibidor de fosfolipase A ₂ da classe beta
γ PLI	Inibidor de fosfolipase A ₂ gama
A ₂₆₀ /A ₂₈₀ /A ₆₀₀	Aborbância nos comprimentos de onda de 260, 280 ou 600 nm
AA	Ácido aracdônico
cDNA	Ácido desoxirribonucléico complementar
CNF	Fator neutralizante de <i>Crotalus durissus terrificus</i>
cPLA ₂	Fosfolipase A ₂ citosólica
CRD	Domínio de reconhecimento de carboidrato
Da	Dalton
DEPC	Dietil Pirocarbonato
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DTT	ditiotreitól
EDTA	Ácido etileno diaminotetracético
EtBr	Brometo de etídio
FPLC	Cromatografia líquida de alta resolução
iPLA ₂	Fosfolipase A ₂ independente de cálcio
IPTG	Isopropil β -D-tiogalacto-piranosídeo
kDA	Quilodalton
LB	Meio de cultura Luria-Bertani
LP	Lisofosfolipídeo
LPC	Lisofosfatidilcolina
LRR	Repetições ricas em leucina
mRNA	RNA mensageiro
Kb	quilobase
nm	Nanômetro
OD	Densidade ótica
PAF-AH	Fator ativador de plaquetas acetilidrolases
pb	Pares de base
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PLI	Inibidor de fosfolipase A ₂
RT-PCR	Transcrição reversa seguida de reação em cadeia da polimerase
SDS	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE	Gel de poliacrilamida contendo SDS
sPLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretória

svPLA ₂	Fosfolipase A ₂ secretória de veneno de serpente
TEMED	N N N`N` tetrametileno diamino
UV	Ultravioleta
X-Gal	5-bromo-4-cloro-3-indoil- β-D-galactosídeo

1. INTRODUÇÃO

1.1. As serpentes e seus venenos

As serpentes pertencem à classe Reptilia, subclasse Lepidosauria, Ordem Squamata e Subordem Serpentes. São popularmente conhecidas como ofídios ou cobras. As serpentes peçonhentas no Brasil são representadas pelas famílias Elapidae e Viperidae.

Atualmente são conhecidas cerca de 2500 a 3000 espécies de serpentes (15% peçonhentas) distribuídas entre 3 grandes famílias: Colubridae, Elapidae (incluindo a subfamília Hydrophiinae) e Viperidae (subfamílias Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae). A família Colubridae apresenta dois gêneros venenosos: *Dispholidus* e *Thelotornis*, encontradas unicamente na África; Serpentes Elapidae são encontradas no Oriente, Austrália, África e América. Membros da família Viperidae se encontram na África, Ásia e Europa e ilhas do Oceano Pacífico; A subfamília Crotalinae é formada por 6 gêneros: *Trimeresurus*, encontrados no Sudeste da Ásia e ilhas do Oceano Pacífico; *Agkistrodon* (encontrado nas Américas Central e Norte, e Ásia) e os gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Sistrurus* e *Lachesis* que habitam apenas o continente americano (Campbell e Lamar, 2004) (Figura 1).

As serpentes peçonhentas mais especializadas são as solenóglifas (família Viperidae) que possuem glândulas venenosas envolvidas por fortes músculos compressores, bem como presas possuidoras de um canal interno fechado, capazes de conduzir as secreções tóxicas até o interior das vítimas quando ocorre a picada (Melgarejo, 2003).

O gênero *Bothrops* compreende 37 espécies as quais ocorrem, em sua grande maioria, na América do Sul. Nas Américas elas são responsáveis pela mais alta taxa de morbidade dentre as serpentes (Campbell e Lamar, 1989). No Brasil, segundo dados do Ministério da Saúde, 29.191 casos de acidentes ofídicos foram notificados em 2006. Dentre estes, 19.791(67,8%) foram devidos às picadas por espécies de *Bothrops* (SINAN/ Ministério da Saúde).



- Famílias Elapidae (a subfamília Hydrophiinae é encontrada no Oceano Pacífico);
Viperidae (subfamília Crotalinae)
- Famílias Colubridae; Elapidae; Viperidae (subfamília Crotalinae)
- Famílias Elapidae; Viperidae (subfamília Crotalinae)
- Família Viperidae (subfamília Viperinae)
- Famílias Elapidae; Viperidae (subfamília Crotalinae)

Figura 1. Distribuição mundial das serpentes peçonhentas (adaptado de Campbell e Lamar, 2004).

As glândulas veneníferas das serpentes estão entre as mais ricas fontes de proteínas e peptídeos biologicamente ativos, os quais são responsáveis por efeitos farmacológicos dramáticos sobre o sistema hemostático, neurológico e muscular. Além desses foram recentemente descritas atividades anticancerígenas e antimicrobianas relacionadas aos venenos (Silva e cols., 1994; Hutton e Warrell, 1993; Estevão-Costa e cols., 2000; De Lima, 2005; Kim, 2006; Tonismagi, 2006).

Baseado na similaridade de seqüências primárias e o principal efeito biológico que provocam, essas proteínas são classificadas em famílias, como as nucleotidasas, metaloproteinases, serino-proteases, desintegrinas, lectinas tipo-C, neurotoxinas, fosfolipases A₂, dentre outras (Klein e Walker, 1986; Bjarnason e Fox, 1994; Ogawa e cols., 2005; Damico e cols., 2006). Esta classificação é, obviamente, muito simplificada e não corresponde à complexidade dos efeitos causados pelo veneno bruto no acidente ofídico.

Serinoproteinases, metaloproteinases e fosfolipases A₂ estão entre as famílias protéicas mais estudadas no meio acadêmico. Elas também têm sido também alvo de intensa pesquisa pela indústria farmacêutica, como modelo para o desenvolvimento de drogas e como ferramentas para o estudo dos mecanismos fisiopatológicos envolvidos em áreas tão diversas como a hemostase sanguínea, drogas anticancerígenas, dor e inflamação, agentes antimicrobiais e doenças neurodegenerativas (Reid, 2005).

1.2. Fosfolipases A₂ (PLA₂)

As fosfolipases A₂ (PLA₂) constituem uma superfamília de proteínas estruturalmente similares que se encontram amplamente distribuídas em venenos de serpentes, escorpiões, abelhas e lagartos (Sosa, 1986; Vandermeers, 1991), além de tecidos vegetais e animais, inclusive humanos (Murakami, 2004) (Tabela 1). Estas enzimas catalisam a hidrólise da

ligação acil éster na posição sn-2 de 1,2-diacil-sn-fosfoglicerídeos, liberando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos (LP), como o ácido araquidônico (AA) e a lisofosfatidilcolina (LPC), os quais são precursores de vários potentes mediadores lipídicos implicados na regulação das funções celulares (Ramoner e cols., 2005). O ácido araquidônico, por exemplo, é convertido em mediadores inflamatórios, prostaglandinas e leucotrienos, pela prostaglandina sintetase e lipoxigenase, respectivamente. Além disso, o AA também pode diretamente modular as funções neurais das células por vários mecanismos, como a alteração da fluidez e estado de polarização das membranas, ativação de proteínas-quinase, estimulação da liberação de cálcio, modulação da ativação de várias enzimas e regulação da transcrição gênica (Farooqui e Horrocks, 2004).

A classificação das sPLA₂ é baseada em vários critérios estruturais e funcionais, como mecanismo catalítico (hidrolases His/Asp, Ser/Asp ou Ser/His/Asp), especificidade para o substrato, e localização celular (Dennis, 1994; Fuentes e cols., 2002; Schaloski e Dennis, 2006). Atualmente as PLA₂ são classificadas em PLA₂ secretórias (sPLA₂), PLA₂ citosólicas dependentes de Ca²⁺ (cPLA₂), PLA₂ intracelulares não dependentes de Ca²⁺ (iPLA₂), fator ativador de plaquetas acetilhidrolases (PAF-AH) e PLA₂ lisossomais. As sPLA₂, por sua vez, são constituídas por 15 grupos e vários subgrupos. Devido ao fato de os genes codificadores para o Grupo II de PLA₂ serem agrupados no mesmo locus cromossomal, elas são também chamadas subfamília de sPLA₂ do grupo II (Hamaguchi e cols., 2003).

Venenos animais contém sPLA₂ dos grupos I, II e III. O Grupo I é composto pelas PLA₂ de venenos das serpentes Elapidae (incluindo a subfamília Hydrophiinae). Neste grupo estão também as sPLA₂ encontradas no pâncreas de mamíferos. O Grupo II é formado pelas sPLA₂ dos venenos de serpentes Viperidae e no Grupo III estão as PLA₂ dos venenos de abelhas e lagartos. Foi feita, recentemente, uma atualização dos grupos de sPLA₂ (Tabela 1) (Schaloski e Dennis, 2006).

Tabela 1- Principais grupos de fosfolipases A₂ secretórias

<i>Grupo</i>	<i>Fonte</i>	<i>Massa Molecular (kDa)</i>	<i>Pontes Dissulfeto</i>
I A	Serpentes Elapidae (cobras e “kraits”) e Colubridae	13-15	7
B	Pâncreas humano e porcino	13-15	7
II A	Serpentes Viperidae, não pancreáticas de mamíferos, sinovial humana	13-15	7
B	Serpentes <i>Bitis</i> sp. (Gaboony viper)	13-15	6
C	Testículo de rato/camundongo	15	8
D	Baço e pâncreas de humanos e camundongos	14-15	7
E	Útero, coração e cérebro humano e murino	14-15	7
F	Testículo e embrião humano e murino	16-17	6
III	Homem, camundongo, abelhas, lagartos, água-viva e escorpiões	15-18 (55, humano e murino)	8
V	Pulmão, coração e macrófagos humano, de rato e camundongo	14	6
IX	Veneno de <i>Conus magus</i> (conodipina M)	14	6
X	Leucócitos, timo e baço humanos	14	8
XI A	Green rice shoots (PLA ₂ -I)	12,4	6
B	Green rice shoots (PLA ₂ -II)	12,9	6
XII	Humano e murino	19	7
XIII	Parvovírus	< 10	0
XIV	Bactérias e fungos simbióticos	13-19	2

(Revisto por Shaloski e Dennis, 2006)

Até 2003 já haviam sido descritas as seqüências primárias de aproximadamente 100 sPLA₂, a maioria provenientes de venenos de serpentes (Kini e cols., 2003). É importante ressaltar que a estrutura global das sPLA₂ é mantida entre os diferentes grupos de animais,

desde caramujos até humanos (Dennis, 1994). Todas são enzimas com massa molecular em torno de 14 kDa (120 – 135 resíduos de aminoácidos) e uma estrutura terciária muito rígida devido à presença de 5 a 8 ligações dissulfeto (Dufton e Hider, 1983). Interessantemente, as sPLA₂ encontradas em parvovírus e na bactéria *Streptomyces violaceoruber* apresentam apenas duas pontes dissulfeto, enquanto que no fungo simbiótico *Tuber borchii*, não há nenhuma (Schaloski e Dennis, 2006). Em mamíferos estas enzimas apresentam massa molecular em torno de 55 kDa devido às extensões amino- e carboxi-terminais (Valentin e cols., 2000b).

Várias atividades tóxicas estão associadas com as sPLA₂ dos Grupos I e II, incluindo neurotoxicidade, miotoxicidade, hemólise, anticoagulação e indução de edema (Kini e Iwanaga, 1986). A atividade neurotóxica mais letal associada com as sPLA₂ do grupo II é o bloqueio pré-sináptico da liberação de acetilcolina dos terminais nervosos, resultando em inibição da transmissão neuromuscular (Kini e Evans, 1989). Por sua vez, as sPLA₂ não neurotóxicas são subdivididas em “Asp49” e “Lys49”, esta última, considerada uma variante das clássicas “Asp49” em que o resíduo 49 (normalmente um aspartato) é substituído por lisina, prejudicando a função catalítica destas toxinas (Maraganore e cols., 1984; Ward e cols., 2002; Lomonte e cols. 2003; Zuliani e cols., 2005).

As fosfolipases A₂ de venenos de serpentes (svPLA₂) Lys49, são particularmente interessantes por apresentarem uma forte atividade miotóxica, seja local ou sistêmica (Teixeira e cols., 2003; Azevedo-Marques e cols., 1985; Zhao e cols., 1999). Fato notável foi a descrição por Rouault e cols. (2003) de uma sPLA₂ de mamíferos que não apresenta atividade enzimática, presente apenas em organismos superiores, que seria a “equivalente” das miotoxinas sPLA₂ de venenos. As sPLA₂ apresentam padrões de distribuição específicos para os diferentes tecidos, sugerindo papéis fisiológicos distintos para cada uma. Além disto, a identificação de receptores específicos para as sPLA₂ em tecidos de mamíferos, sugere a possibilidade de que as sPLA₂ não apenas sejam enzimas, mas

também atuam como ligantes, independentemente de sua função catalítica (Lambeau e Lazdunski, 1999; Higashino e cols., 2002; Triggiani e cols., 2005).

Evolução acelerada de enzimas PLA₂

Acredita-se que as glândulas veneníferas tenham evoluído a partir de glândulas digestivas, sendo que a função ancestral dos venenos era a digestão da presa (Kochva e cols., 1983; 1987). Entretanto, algumas destas proteínas e peptídeos evoluíram em potentes toxinas (Valentin e Lambeau, 2000). Diversos pesquisadores têm relatado uma evidente evolução acelerada em regiões codificadoras de proteínas denominadas “hot spots” (Figura 2) nos genes das glândulas de venenos de serpentes relacionadas à enorme diversidade de funções protagonizadas pelos venenos (Ohno e cols. 1998; Ogawa e cols. 1992; Fry, 2005). Ogawa e cols. (1992) estudaram seqüências nucleotídicas de genes codificando isoenzimas de sPLA₂ de *Trimeresurus flavoviridis* (Crotalinae) e observaram que as regiões codificando proteínas são menos conservadas do que os íntrons e que substituições aceleradas têm ocorrido nas primeiras, exceto para o domínio do peptídeo sinal. Essa hipótese foi posteriormente confirmada, através do alinhamento de seqüências nucleotídicas de cDNAs codificando sPLA₂ tanto de venenos de serpentes Viperinae e Crotalinae quanto de sPLA₂ de mamíferos (Nakashima e cols., 1993, 1995; Nobuhisa e cols., 1996).

Grupo I

Grupo II

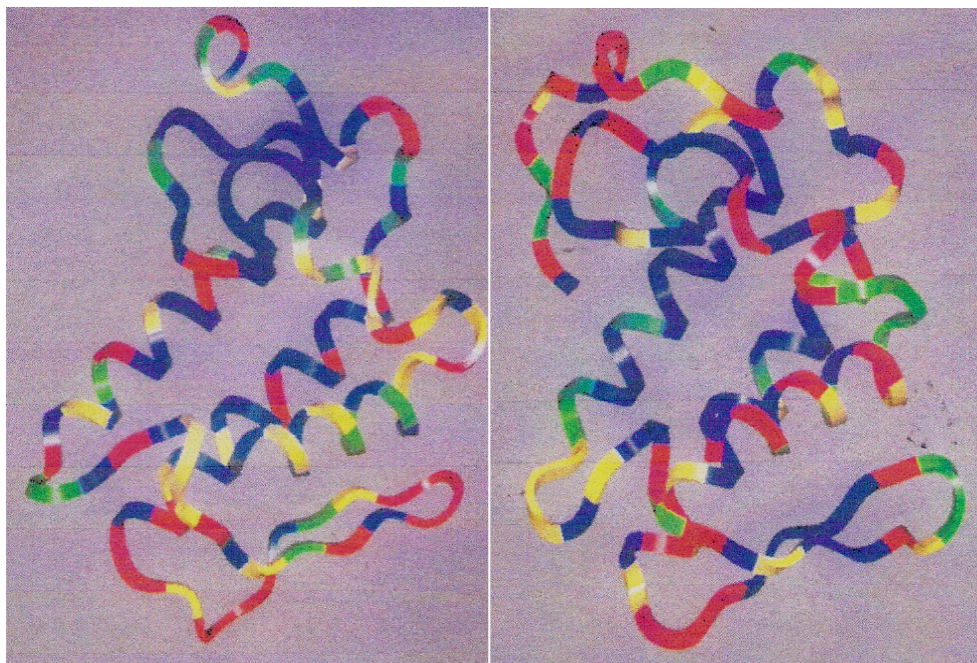


Figura 2. Frequência de mutação de resíduos nas sPLA₂ dos Grupos I e II em serpentes: vermelho: 60-80% (“hot spots”); amarelo: 40-60%, verde: 20-40%, azul: 0-20% (Kini & Chan, 1999).

1.3. Inibidores naturais de PLA₂ (PLIs)

Inibidores naturais de venenos de serpentes são amplamente descritos na literatura. Desde a sua descoberta foi atribuída, aos inibidores no sangue circulante de serpentes, a função de proteção do animal frente a um extravasamento do conteúdo da glândula venenífera, acidental ou devido aos hábitos alimentares de espécies ofiófagas (serpentes que se alimentam de outras) (Cerdas e Lomonte, 1982; Miranda e cols., 1982; Omori-Satoh e cols., 1972; Tomihara e cols., 1988; Vellard, 1945). A co-existência de inibidores com especificidades complementares, inclusive, está de acordo com essa hipótese, considerando a variabilidade das fosfolipases A₂ de peçonhas. Entretanto, o isolamento de inibidores no plasma sanguíneo de serpentes não venenosas e não ofiófagas, que nem mesmo possuem glândulas veneníferas ou fosfolipases tóxicas em seu sistema, levantou a hipótese de outros papéis fisiológicos importantes para essas moléculas endógenas nas serpentes e da existência de proteínas homólogas em outros animais (Okumura e cols., 1999b; 2003).

Um modelo para o mecanismo de ação destes inibidores foi proposto por Kini e Evans (1989), em que tais moléculas inibitórias seriam seletivas para proteínas-alvo tecido-específicas onde se ligariam com alta afinidade. Esta hipótese tem sido evidenciada após uma crescente descrição na literatura de proteínas ligantes-específicas para as PLA₂, incluindo dois tipos de receptores, estrutural e farmacologicamente distintos, identificados em mamíferos (revisto por Lambeau e Lazdunski, 1999): os receptores tipo-N, cuja estrutura ainda é desconhecida, se ligam a neurotoxinas de venenos de serpentes (Krizaj e Gubensk, 2000; Ming-Jhy, 1999); e os receptores tipo-M similares aos receptores de lectina tipo-C em animais. Estes últimos são proteínas de membrana cuja principal característica é a presença de repetições de um domínio de reconhecimento de carboidrato (CRD) (Figura 3), claramente envolvido na ligação às enzimas. Por outro lado, outro tipo

de receptor tipo-M, porém solúvel, foi identificado em humanos (Lambeau e Lazdunski, 1999; Higashino e cols., 1994, 2002).

O primeiro inibidor específico para svPLA₂s (PLI) foi purificado a partir do sangue de uma serpente Crotalinae asiática, a *Trimeresurus flavoviridis*, por Kihara (1976). Desde então, um número crescente destas moléculas têm sido descrito na literatura tanto para serpentes venenosas como para as não venenosas. Os inibidores de sPLA₂ do plasma de serpentes venenosas ou não, apresentam várias características em comum. Eles são glicoproteínas multiméricas com massas moleculares variando entre 75 a 180 kDa e exercem sua atividade inibitória através da formação de complexos solúveis com as sPLA₂.

Em 1997, Okhura e cols. propuseram a organização destes inibidores em três classes (α , β e γ), os quais podem coexistir numa única serpente (Okhura e cols., 1997; Lizano e cols., 2000). Na Figura 3 são mostrados exemplos de estruturas relacionadas às três classes de PLIs. Os inibidores de PLA₂ do tipo alfa (α PLIs) são oligômeros glicosilados contendo três a seis subunidades de 147 resíduos de aminoácidos e massa molecular variando entre 20 a 25 kDa, ligadas não covalentemente (Inoue, 1991; Lizano e cols., 2003; Okhura, 1993, 1997). Apresentam estrutura similar ao domínio de reconhecimento de carboidratos (CRD) das lectinas dependentes de Ca²⁺ (família CTLD, do inglês “C-type lectin-like domain”). Estes domínios estão presentes também nas proteínas ligantes de manose de mamíferos, como a proteína surfactante pulmonar apoproteína A (SP-A) (Fisher e Chander, 1994) e o receptor do tipo-M (Lambeau e Lazdunski, 1999) e sua forma solúvel (Higashino e cols., 2002). Inibidores desta classe foram purificados do plasma de várias serpentes Crotalidae (revisito por Fortes-Dias, 2000; Broady e Dunn, 2000): *Trimeresurus flavoviridis* (Kogaki e col., 1989), *Agkistrodon blomhoffii siniticus* (atualmente renomeada para *Gloydius b. siniticus*) (Ohkura e col., 1993); *Bothrops asper* (Lizano e cols., 1997), *Cerrophidion godmani* (Lizano e cols., 2000), *Bothrops moojeni* (Soares e cols., 2003) e *Atropoides nummifer* (Quirós e cols., 2007) (Tabela 2).

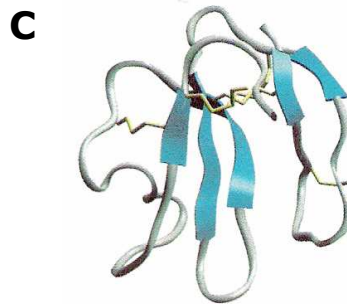
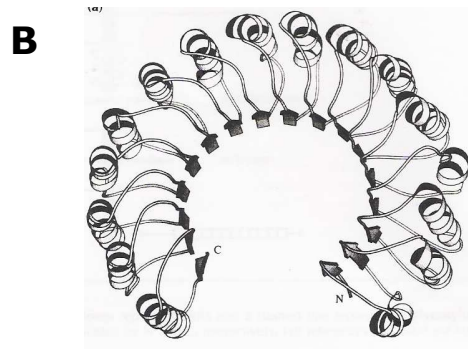
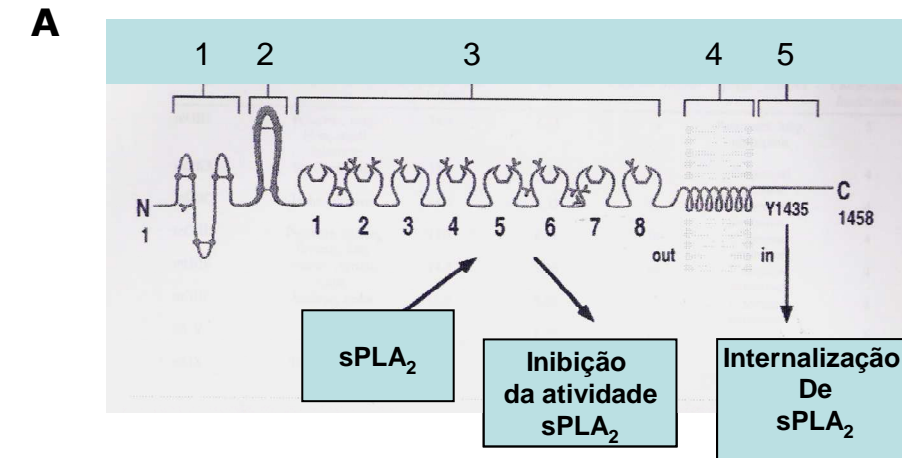


Figura 3. Classes estruturais de inibidores de sPLA₂ (PLIs). A.-Alfa: estrutura contendo domínios de reconhecimento de carboidratos (CRD) e prováveis regiões de interação com as sPLA₂. Os números se referem a (1) domínio rico em cisteína, (2) domínio tipo fibronectina tipo II, (3) domínio CRD, (4) domínio transmembrana e (5) domínio citoplasmático; B- Beta: estrutura contendo domínios ricos em leucina (LRR); C- Gama: estrutura contendo domínios de três-dedos (Ohkura e cols., 1999).

Além destas, uma proteína similar, que não apresenta atividade inibitória sobre PLA₂, foi isolada da serpente não venenosa *Elaphe quadrivirgata*, da família Colubridae (Okumura e col., 2003). Acredita-se que estes inibidores sejam específicos para o grupo II de PLA₂ ácidas de seus próprios venenos. Alguns também são capazes de neutralizar os efeitos pró-inflamatórios de PLA₂s miotóxicas básicas, como no caso dos inibidores de miotoxinas presentes no plasma de *B. asper* e *C. godmani* (Lizano, 1997; 2000).

Para a segunda classe de inibidores, tipo- β , foram descritos até hoje apenas dois representantes. Os β PLIs apresentam uma característica estrutural importante: a presença de repetições ricas em leucina (LRR) (Figura 3), essenciais para diversos processos celulares como o desenvolvimento neuronal, imunidade inata e morfogênese cerebelar, dentre outros (Kobe e Kajava, 2001; Matilla e Radrizzani, 2005; Bell e cols., 2005).

Em 1994, Fortes-Dias e cols. isolaram do plasma da cascavel sulamericana (*C. d. terrificus*), um potente inibidor da crotoxina, principal PLA₂ presente no veneno destas serpentes. O inibidor, chamado CNF, tornou-se o protótipo de uma série de outras moléculas semelhantes, cujas características recaem na classe dos inibidores tipo γ . Inibidores γ PLI são os que apresentam o maior espectro de inibição frente às sPLA₂ (Inoue, 1997; Fortes-Dias, 1999). Eles são estruturalmente similares às proteínas três-dedos (Figura 3), compostos por motivos estruturalmente semelhantes ao ativador do receptor de plasminogênio tipo uroquinase (u-PAR), aos antígenos de superfície celular da superfamília Ly-6 e à CD59. Suas seqüências contêm dois “clusters” de resíduos cisteína repetidos em série (Okhura, 1994).

Tendo em vista a evidente evolução acelerada detectada para as svPLA₂s, alguns autores têm hipotetizado que os inibidores destas toxinas, poderiam ter sofrido um processo co-evolucionário (Dennis e Florence, 1990; Deshimaru, 1996), mas ainda não existem comprovações definitivas.

Tabela 2 - PLIs endógenos purificados do plasma de serpentes

Classe	Espécie	Identificação	Massa Molecular e Estrutura
α (CRD-like)	<i>Gloydius blomhoffi siniticus</i>	PLI α	75 kDa, homotrímero
	<i>Bothrops asper</i>	BaMIP	120 kDa, homopolímero
	<i>Bothrops moojeni</i>	BmMIP-II	homopolímero
	<i>Cerrophidion goodmani</i>	CgMIP-II	180 kDa, homopolímero
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	PLI-A,B(IV,V)	100 kDa, heteropolímero
	<i>Atropoides nummifer</i>	AnMIP	92 kDa, homotrímero
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	PLI α -LP	51 kDa, trímica
β (Leucine-rich)	<i>Gloydius blomhoffi siniticus</i>	PLI β	160 kDa, homotrímero
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI β	150 kDa, heterotrímero
γ (u-PAR-like)	<i>Gloydius blomhoffi siniticus</i>	PLI γ	100 kDa, heteropolímero
	<i>Cerrophidion godmani</i>	CgMIP-I	180 kDa, homopolímero
	<i>Crotalus durissus terrificus</i>	CNF, CICS	140-160 kDa, homopolímero
	<i>Cerrophidion goodmani</i>	CgMIP-I	110 kDa, homopolímero
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI γ	130 kDa, heteropolímero
	<i>Laticauda semifasciata</i>	LsPLI γ	100 kDa, heterotrímero
	<i>Naja naja kaouthia</i>	PLI	90 kDa, heterotrímero
	<i>Notechis ater</i>	NasI	heteropolímero
	<i>Notechis ater serventyi</i>	NSI	heteropolímero
	<i>Notechis scutatus</i>	NSI	heteropolímero
	<i>Oxyuranus scutellatus</i>	OSI	heteropolímero
	<i>Oxyuranus microlepdotus</i>	OMI	heteropolímero
	<i>Pseudonaja textilis</i>	PTI	heteropolímero
	<i>Python reticulatus</i>	PIP	homopolímero
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i>	PLI-I, II	polímero
Não determinado	<i>Vipera palestinae</i>	ANF	56 kDa, ?

* Dados atualizados a partir de Fortes-Dias (2002)

2. JUSTIFICATIVA E RELEVÂNCIA

As pesquisas no campo de toxinas de origem animal têm contribuído muito na compreensão, por exemplo, dos problemas vasculares, processos inflamatórios, mecanismos de dor, processos alérgicos e asma brônquica. Vários laboratórios farmacêuticos têm se utilizado de toxinas naturais, como modelos de drogas para o desenvolvimento de seus produtos.

No Brasil temos incontáveis exemplos de substâncias presentes em venenos de animais, haja visto a nossa biodiversidade. Exemplo bem estudado é a peçonha de *C. d. terrificus* cuja toxicidade e letalidade devem-se, principalmente à presença da crotoxina – uma svPLA₂. A crotoxina é uma neurotoxina pré-sináptica do grupo beta, que bloqueia a transmissão neuromuscular, pela alteração da liberação de acetil colina nos terminais nervosos (Vital-Brazil, 1966; Santos e cols., 2005). A crotoxina é um complexo heterodimérico de subunidades protéicas: CA, uma proteína ácida, não tóxica, enzimaticamente inativa e CB, que é responsável pela atividade fosfolipásica exibida pela crotoxina (Rubsamen e cols., 1971). Quando a crotoxina interage com membranas biológicas CA e CB se dissociam, sendo que CB liga-se à membrana, enquanto CA fica livre em solução (Bom e Jeng, 1979). Embora o alvo biológico da crotoxina não esteja bem esclarecido, existem suposições do envolvimento de uma proteína como acceptor (Radvanyi e cols., 1989). Existe um modelo hipotético geral para a ação de PLA₂ de venenos, que postula a ligação seletiva da enzima a sítios protéicos de alta afinidade, tecido-específicos (Vucemilo, 1998). As evidências que suportam essa hipótese tem se acumulado, após a identificação de uma série de proteínas ligantes específicas de PLA₂, incluindo uma proteína de membrana denominada receptor tipo-M, composta por um domínio aminoterminal de reconhecimento a carboidratos (CRD) (Lambeau e Lazdunski, 1999). Foi evidenciado que os CRD são elementos estruturais importantes no reconhecimento de

PLA₂ (Nobuhisa e cols., 1998). Embora tenha havido progresso significativo no estudo das fosfolipases A₂ e seus aceptores naturais (receptores ou inibidores) existem ainda muitos pontos obscuros, especialmente nas interações proteína-receptor, seja ele ligado à membrana ou solúvel, e nas relações evolutivas toxinas-antitoxinas endógenas. Dados recentes têm mostrado que a especificidade dos inibidores não está restrita à PLA₂ secretórias de peçonhas, tendo sido isolado pelo menos um inibidor capaz de inibir fosfolipases A₂ humanas da classe II (Higashino, 1994; 2002; Hseu, 1999; Kirkpatrick, 2000). O achado estende a utilização dessas moléculas como modelos para o desenvolvimento de drogas para tratamento de diversas doenças humanas ligadas à atividade PLA₂.

A principal dificuldade no desenvolvimento de um inibidor universal de PLA₂ é que as células de mamíferos geralmente contém mais de uma PLA₂, tornando difícil entender a regulação a nível molecular. Inibição não-seletiva de PLA₂ iria também bloquear outras reações mediadas pelas PLA₂ que, embora não diretamente envolvidas na inflamação, são necessárias para a função celular normal. Desse modo, a questão chave é: qual a PLA₂ está envolvida na geração dos mediadores lipídicos da inflamação? Responder a esta pergunta requer conhecimento das características dos diversos grupos e subgrupos de PLA₂ atualmente conhecidas. Compostos típicos reportados como inibidores clássicos de PLA₂ incluem drogas que geralmente não inibem PLA₂ *per si*, mas atuam bloqueando a interação da PLA₂ com seus substratos ou mesmo com o Ca²⁺ (Balsinde e cols., 1999). Portanto, a falta de especificidade de tais compostos indica que em sistemas celulares totais, estes compostos irão provavelmente interagir com muitas proteínas diferentes, tornando impossível se chegar a conclusões definitivas a respeito de seus efeitos.

As propriedades neutralizadoras do efeito letal e tóxico das peçonhas de serpentes abrem, a princípio, a possibilidade de desenvolvimento de antídotos específicos, naturais ou recombinantes, para prevenção e/ou tratamento de acidentes ofídicos.

Proteínas plasmáticas com atividade antiveneno apresentam um grande potencial. Além de constituírem ferramentas importantes para estudos neuroquímicos, sua disponibilidade para uso, seja como antídotos específicos na neutralização de envenenamentos, seja como modelos moleculares no desenvolvimento de antídotos sintéticos ou recombinantes, abre novas perspectivas na área de antivenenos. Resultados preliminares mostram ainda, que moléculas similares aos inibidores plasmáticos são expressas também em diversos órgãos de mamíferos, o que implica em um papel importante para essa classe de proteínas em interações moleculares, além de despertar o interesse por seu estudo evolutivo (Fortes-Dias e cols., dados não publicados).

Em termos de geração de conhecimentos básicos, o mecanismo de ação anti-tóxica transforma esses inibidores em ferramentas importantes para estudos neuroquímicos, interações com receptores e interações proteína-proteína. Além do potencial biotecnológico, há de ser considerada a rica biodiversidade da fauna brasileira, disponibilizando uma gama variada de espécies de serpentes pouco exploradas neste campo específico. A inibição de PLA₂ específicas constitui uma abordagem potencialmente útil no tratamento de desordens inflamatórias crônicas e agudas. Infelizmente até hoje não existe nenhum inibidor que seja potente e absolutamente tipo específico. O que encontramos atualmente são protótipos razoáveis para o desenvolvimento de drogas mais seletivas.

A nossa proposta de trabalho é estudar inibidores das classes gama e alfa, sob dois aspectos: molecular e bioquímico. No caso dos inibidores gama, tendo CNF como modelo, além de mapear a ocorrência de moléculas similares em serpentes brasileiras de outros gêneros, através de técnicas básicas de biologia molecular, pretendemos aprofundar o estudo do mecanismo de ação e estrutura molecular das formas nativa e recombinante dos inibidores. Para os inibidores da classe alfa, raramente descritos em serpentes brasileiras ou sul-americanas, será feita a prospecção inicial nas espécies de serpentes disponíveis da

subfamília Crotalinae. Esperamos montar, com isto, um banco de cDNAs, os quais serão clonados e seqüenciados. Este banco poderá ser usado para diversos estudos envolvendo a inibição de uma série de grupos de sPLA₂.

3. OBJETIVOS

3.1. Geral

Prospectar e caracterizar possíveis inibidores de PLA₂ (PLIs) das classes alfa e gama, em serpentes brasileiras da subfamília Crotalinae.

3.1.2. Específicos

1. inibidores da classe alfa

- Investigar a presença de cDNAs codificadores de α PLIs em serpentes brasileiras: *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. newiedi*, *C. durissus terrificus* e *L. muta*
- Clonar, seqüenciar e deduzir as estruturas primárias, secundárias e terciárias dos α PLIs encontrados e proceder análises estruturais utilizando ferramentas de bioinformática
- Gerar árvores filogenéticas a partir das seqüências nucleotídicas obtidas para os α PLIs
- Testar a atividade inibitória dos novos α PLIs usando proteínas recombinantes expressas em sistema heterólogo procariota

2. Inibidores da classe gama

- Investigar a presença de cDNAs codificadores de γ PLIs em serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*: *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. newiedi*
- Clonar, seqüenciar e deduzir as estruturas primárias, secundárias e terciárias dos γ PLIs encontrados e proceder análises estruturais utilizando ferramentas de bioinformática
- Gerar árvores filogenéticas a partir das seqüências nucleotídicas obtidas para os γ PLIs

3. Analisar comparativamente os resultados obtidos para as duas classes de inibidores.

4. MATERIAIS

4.1. Reagentes em geral

Todos os reagentes não especificados foram de grau analítico, de procedência: Sigma Chemical Company (St. Louis, EUA), Merck (Darmstadt, Alemanha) ou GE Healthcare (EUA). Em todos os experimentos foi utilizada água ultrapura.

4.2. Soluções e meios de cultura

Meio LB (Bactotripton 10,0 g/l, Bacto yeast extract 5,0g/l, NaCl 10,0 g/l solubilizados em H₂O destilada, pH 7,5 ajustado com NaOH); LB ágar (1,5%: Bactotripton 10,0 g/l, Bacto yeast extract 5,0 g/l, NaCl 10,0 g/l, ágar 15,0 g/l, solubilizados em H₂O destilada, pH 7,5 ajustado com NaOH); 2xYT (Bactotripton 16,0 g/l, Bacto yeast extract 10,0 g/l, NaCl 5,0 g/l, MgCl₂ ou MgSO₄ 10 mM, solubilizados em H₂O destilada, pH 7,0 ajustado com NaOH); SOC incompleto (Bactotripton 20 g/l, “Bacto yeast extract” 5 g/l, NaCl 0,58 g/l, KCl 0,19 g/l, solubilizados em H₂O destilada, pH 7,0 ajustado com NaOH 5N); SOC completo (SOC incompleto, MgCl₂ 2 M 10% v/v, Glicose 2M 10% v/v). Todos os meios foram autoclavados.

TE: Tris-HCl 10 mM pH 7,5 , EDTA 1 mM pH 8,0

TBE: Tris-HCl 89 mM, ácido bórico 89 mM, EDTA 2 mM pH 8,0

4.3. Linhagens bacterianas

Células *E. coli*: InvαF' e TOP10 (Invitrogen, USA); BL21(DE3)pLysS (Novagen, EUA)

4.4. Vetores plasmidiais

Os vetores de clonagem usado neste trabalho foram o TA PCR 2.1 e TOPO PCR 2.1, comercializados pela Invitrogen (EUA) e o pET-32c(+) (Novagen, EUA).

4.5. Kits

A) *Produtos da Invitrogen – Life technologies, EUA*: TOPO TA Cloning; TA Cloning Kit (versão 2.1); ThermoScript Reverse Transcriptase; Platinum Taq DNA Polymerase; First Strand cDNA Synthesis - Produtos da Qiagen, Alemanha - QIAprep Spin Miniprep Kit.

B) *Produtos da GE Helthcare –EUA*: Thermo sequenase Cy5 Dye Terminator, para AlfExpress; DyEnamic ET Dye Terminator Cycle Sequencing Kit, para MegaBace; Kit para purificação de DNA (GFX PCR DNA and Gel Band Purification Kit); Kit para extração de DNA plasmidial (FlexiPrep Kit).

4.6. Resinas Cromatográficas

Sephadex G75 , HiTrap Quelating e Sepharose-4B ativada com brometo de cianogênio (GE Helthcare, EUA).

4.7. Proteínas e enzimas

PlatinumTaq DNA polimerase 5U/μl (Invitrogen – Life technologies , EUA); *Hind* III 20,000 U/ml; *Kpn* I 10,000 U/ml, BSA 10 mg/ml e T4 DNA Ligase 1 U/μl (BioLas, EUA).

5. METODOLOGIA

5.1. Obtenção dos tecidos de serpentes

As serpentes, após classificação, foram anestesiadas em gelo seco e em seguida foram sacrificadas por decapitação. Após a coleta do sangue, as serpentes foram abertas com tesoura e o fígado de cada serpente foi cuidadosamente retirado, tendo-se o cuidado de usar tesouras e pinças separadas para cada espécie. Estes foram picados em pequenos pedaços e armazenados em microtubos novos e tratados com DEPC. Cada tubo foi imediatamente congelado em nitrogênio líquido até a estocagem em freezer a $-80\text{ }^{\circ}\text{C}$.

Todas as serpentes utilizadas neste trabalho tiveram o mesmo tratamento, exceto *L. muta* que foi obtida recém morta por causas naturais no serpentário da Funed.

5.2. Isolamento de RNA total

O RNA das serpentes foi isolado de acordo com o método do reagente de Trizol (Trizol® LS Reagent; GibcoBRL, Estados Unidos), segundo as recomendações do fabricante. Aproximadamente 120 mg de fígado congelado das serpentes em estudo foram triturados até formar um pó fino, adicionando-se N_2 líquido continuamente para não descongelar. À amostra pulverizada foi adicionado o Trizol na proporção de 1 ml para cada 50-100 mg de tecido.

As amostras homogeneizadas eram incubadas à $30\text{ }^{\circ}\text{C}$ por 5 minutos para uma completa dissociação do complexo de nucleoproteínas. Após a incubação foi adicionado clorofórmio na proporção de 0,2 ml para cada 1 ml de Trizol. Os tubos foram então agitados vigorosamente por 15 segundos e novamente incubados por 5 minutos a $30\text{ }^{\circ}\text{C}$. Em seguida

as amostras foram centrifugadas a 2.900 x g durante 15 minutos à 4 °C em microcentrífuga (Eppendorf 5415C).

Após a centrifugação as misturas se separam em uma fase inferior vermelha, a fase fenol-clorofórmio, uma interfase e uma fase superior aquosa não colorida. O RNA, que permanece exclusivamente na fase aquosa, foi transferido para um novo tubo e precipitado com álcool isopropílico, na proporção de 0,5 ml para cada 1 ml de Trizol[®] usado na homogeneização inicial. Em seguida as amostras foram incubadas durante 10 minutos a 30 °C e centrifugadas a 11.600 X g por 10 minutos a 4 °C . Os RNAs precipitados foram lavados uma vez com 1 ml de etanol 75 % e novamente centrifugados a 4600 X g durante 15 minutos a 4 °C. Após a última centrifugação, os RNAs foram deixados secar ao ar, tendo-se o cuidado de não deixar que secasse completamente a fim de não diminuir sua solubilidade. Depois de secos os RNAs foram ressuspensos em água tratada com DEPC para uso imediato, ou em Formamida 100% deionizada para estocagem à - 70 °C.

5.3. Qualidade do RNA total

A qualidade do RNA total foi verificada em gel agarose a 1%, preparado com TBE. A amostra (0,5 – 2 µg) solubilizada em H₂O-DEPC contendo tampão da amostra (10 % de sacarose, 90 % de formamida deionizada, 0,05 % de azul de bromofenol e 0,05 % de xilenocianol) e 2 µl de brometo de etídio 0,1 mg/ml, foi adicionada ao gel após aquecimento a 65 °C por 3 minutos e em seguida resfriada à temperatura ambiente. O gel foi corrido a 100 V/cm em tampão TBE e fotografado sob iluminação UV, como para géis de DNA.

5.4. Desenho e síntese de oligonucleotídeos

Oligonucleotídeos para o inibidor alfa das serpentes Crotalinae, foram construídos baseados em seqüências publicadas de um inibidor similar isolado do plasma de *Gloydius blomhoffii siniticus* (GI: ABO26666, Ohkura e cols., 1997) e usados como sondas na procura dos transcritos destes inibidores a partir dos cDNAs preparados para cada serpente. Foram usados vários pares incluindo aqueles complementares às seqüências internas ou à região flanqueadora da seqüência madura, ou ainda às regiões externas ao peptídeo sinal, em várias combinações diferentes, para verificar quais iniciadores eram capazes de reconhecer alguma seqüência do cDNA codificador das PLIs.

Os seguintes pares de iniciadores foram usados nas pesquisas de α PLIs: (P1) senso, se anela à seqüência externa ao peptídeo sinal (5'UTR): 5'GGA AGG AAA GTA CTT TCT CTG GAG 3', (P2) antisenso, carboxi-terminal: 5'GTA GGT GCT CTA CAT TTT GAC GTC TCC TG3', (P3) senso, se anela à região codificadora da proteína madura: 5'CAT GAG ACA GAT CCT GAC GGA3'. Para a clonagem e expressão de recombinantes foram usados os seguintes iniciadores: MI001 Senso, aminoterminal, para proteína madura, com sítio para enteroquinase e sítio de restrição para *Kpn* I:

5'GC G GTA CCA GAC GAC GAC GAC AAG CAT GAG ACA GAT CCT 3',
Sítio *Kpn*I Sítio enteroquinase

e MI002 antisenso, carboxi-terminal com sítio de restrição para *Hind* III:

5'GAG AGA CGC AAG CTT T CA TAA AAT GAA ATA AAA CTC ACA CAC GAC 3'.
Sítio *Hind*III

Para o γ PLIs foram utilizados os iniciadores desenhados com base na seqüência de DNA obtida para o CNF de *Crotalus durissus terrificus* por Fortes-Dias e cols. (1994): (P1) senso, se anela à região codificadora da proteína madura: 5'CGC TCA TGT GAC TTT TGT CAC3'; (P3) senso, 5'UTR (iniciador usado para amplificação das seqüências de *B.*

alternatus) : 5'GGC TGT ATG GAT ATT TCT TCC AGG 3' e (P2) antisense, carboxi-terminal: 5'TCA GAG GCT TGC CAA TCT GAT G 3'.

5.5. Síntese dos cDNAs codificadores dos inibidores

A síntese da primeira fita do cDNA foi feita de acordo com as instruções contidas no kit apropriado obtido da Invitrogen (First-strand cDNA synthesis; Invitrogen, USA), como se segue: uma mistura de RNA total (2 µg) e 1 µl de oligo(dT)₁₂₋₁₈ em um volume total de 12 µl H₂O-DEPC, foi aquecida a 70°C por 10 minutos e, em seguida, resfriada em gelo. Em outro microtubo contendo 2 µl do tampão de reação, 2 µl de MgCl₂, 1 µl da mistura de dNTPs e 1 µl de solução de DTT foram adicionados à 7 µl da mistura RNA-oligo(dT), num volume final de 20 µl. A solução foi misturada por pipetagem e incubada a 42°C por 5 minutos, quando então adicionou-se a enzima SuperScript II RT (1 µl; 200U). A mistura foi novamente incubada a 42 °C por 50 minutos. Terminou-se a reação pela incubação a 70 °C durante 15 minutos e esfriou-se em gelo por 2 minutos. Os cDNAs resultantes foram utilizados para PCRs com iniciadores específicos ou estocados a – 80 °C até o uso.

5.6. Clonagem dos insertos

Os cDNAs sintetizados foram utilizados nas PCRs, tendo como iniciadores os oligonucleotídeos P1/P2 e/ou P4/P2 para o inibidor alfa e P1/P2 ou P3/P2 para o inibidor gama. As condições das PCRs foram as seguintes: 4 minutos a 94 °C, 35 ciclos de 30 segundos a 94 °C, 30 segundos a 55 °C, e 1 minuto a 72 °C seguido de um período de extensão de 5 minutos a 72 °C.

Os produtos das PCRs foram analisados em gel agarose a 1% contendo brometo de etídeo e visualizados em transluminador sob iluminação UV. Este gel foi usado na estimativa da

concentração de inserto. Análise semelhante foi feita para estimativa da concentração de DNA plasmidial a ser usada na ligação do inserto.

A ligação do inserto ao vetor foi realizada conforme recomendações do fabricante: uma curva para se determinar o volume de cDNA a ser usado foi feita através da comparação de bandas obtidas em gel agarose 1% contendo brometo de etídeo dos produtos de PCR ainda recentes (menos de 24 horas). Para estimar a quantidade de produto de PCR a ser usada na ligação, foi utilizada como padrão a banda de 1636 pb do marcador de peso molecular de 1 Kb ladder (Gibco), na concentração de 100 ng/μl. Esta banda corresponde a 45 ng de DNA aplicados no gel. Sendo assim, após a aplicação de 8 μl desta amostra, uma banda contendo aproximadamente 15 ng de DNA foi obtida, segundo a fórmula dada pelo manual (Invitrogen, EUA). De acordo com este procedimento foi determinada uma quantidade de 9ng de produto de PCR para realizar a ligação ao vetor visto que o tamanho do inserto é de aproximadamente 700 pares de bases, numa proporção molar de 1:1 (50 ng de vetor).

Após a visualização da amplificação dos insertos em gel agarose 1%, corados com brometo de etídeo, os produtos da PCR foram utilizados para a reação de ligação no vetor TOPO TA pCR 2.1 ou TA cloning pCR 2.1 vector (ambos da Invitrogen, EUA), conforme recomendações do fabricante. Os produtos das ligações foram utilizados para a transformação em células competentes.

5.7. Preparação de células competentes

Um raspado do estoque de células Inv α F` congeladas à -80 °C foi inoculado em 5 ml de meio de cultura LB e incubado a 37 °C por 16 horas sob agitação. Desta pré-cultura foram retirados 0,4 ml e inoculados em 40 ml de meio LB em erlmmeyer de 500 ml. A cultura foi incubada a 37 °C sob agitação por aproximadamente 2 horas até atingir uma densidade ótica de 0,5 em A₆₀₀ nm. Em seguida a cultura foi transferida para um tubo de centrífuga de

50 ml previamente resfriado e centrifugado a 3000 rpm por 10 minutos a 4°C em centrífuga Bekman GS-6R. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspensas em 20 ml de solução de CaCl₂, 50 mM gelada. As células foram incubadas em banho de gelo por 20 minutos e centrifugadas como anteriormente. Após a segunda centrifugação, as células foram ressuspensas em 4 ml de solução de CaCl₂ gelada e, após 1 hora, usadas para transformação.

5.8. Transformação

As células competentes foram mantidas em gelo durante todo o período de experimentação. Para a transformação foram usados 2 µl de solução de ligação adicionados a uma solução de Tris HCl 50 mM pH 7,2 para um volume final de 50 µl. A esta mistura foram adicionados 50 µl de células competentes, em tubos de polipropileno de 5 ml e incubados em banho de gelo por 40 minutos. Após este período os tubos foram aquecidos em banho-maria a 42 °C por 30 segundos sem agitação e novamente transferidos para banho de gelo por 2 minutos.

Foram então adicionados 250µl de meio de cultura SOC e incubados sob agitação por aproximadamente 90 minutos. Esta cultura foi usada para inocular placas de cultura contendo 25 ml de LB, kanamicina (100 µg/ml) e 40 µl de uma solução 40 mg/ml de X-Gal/placa. Duas placas foram utilizadas para cada tubo de ligação/transformação, por serpente. As placas foram estriadas com 100 e 200 µl de células, incubadas a 37 °C durante 18 horas e, em seguida, a 4°C por 2 horas para que a cor azul das colônias fosse completamente definida. As colônias foram então contadas para se calcular o rendimento entre brancas e azuis. As colônias brancas e azuis claras foram crescidas em meio SOC contendo kanamicina (100 µg/ml) da seguinte forma: em cada tubo de 15 ml contendo 3 ml de meio foi inoculada uma colônia bem isolada e deixada crescer aproximadamente 12

horas. Estas culturas foram então estriadas em placas LB/Kan/X-Gal e receberam um número para cada colônia/clone. Em seguida a cultura foi utilizada para extração, purificação do DNA plasmidial e PCR com os iniciadores correspondentes às regiões proteína madura/carboxi-terminal.

Os produtos da PCR foram visualizados em gel, como anteriormente, e detectados os clones positivos para os insertos. Estes clones foram estocados em freezer a -80°C após a adição de 10 % de glicerol 80%.

5.9. Preparação do DNA plasmidial (miniprep)

A purificação dos DNAs plasmidiais foi feita utilizando-se um kit comercial (QIAprep Spin Miniprep Kit, QIAGEN, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante. Os DNAs puros foram obtidos em tampão Tris-Cl 10 mM, pH 8,5 e o rendimento foi monitorado por leitura $A_{260\text{nm}}$ em espectrofotômetro (GeneQuant, GE Healthcare).

5.10. Sequenciamento do DNA plasmidial recombinante

Após extração e purificação do DNA plasmidial, os clones recombinantes positivos para os insertos das várias serpentes foram utilizados como molde para seqüenciamento automático, de acordo com os seguintes protocolos:

5.10.1. Para seqüenciador Alf Express System (GE Healthcare)

A reação de seqüenciamento para aparelho “Alf Express System” (GE Healthcare) foi feita segundo as instruções contidas no manual do kit obtido comercialmente (Thermo SequenaseTM CyTM5 Dye Terminator Kit; GE healthcare): 4 μl de DNA de cada clone foram misturados a 2 μl do oligonucleotídeo M13 (- 40 senso: GTCGCCGTCGTTTTAC) e

M13 (antisense: TCACACAGGAAACAGCTATGAC) 3,5 µl do tampão de reação, 1 µl da enzima Thermo Sequenase DNA polimerase (10 U/µl) e H₂O para um volume final de 27 µl. Desta mistura foram adicionados 6 µl a um novo tubo já contendo 2 µl de uma pré-mistura onde 4 microtubos foram rotulados com as bases A, C, G e T. Cada pré-mistura era composta de: 4 µl de dNTP 1,1 mM, 2 µl de Cy5ddNTP e 16 µl de H₂O deionizada. A reação foi submetida a um termociclador (GeneAmp PCR System 2400, Applied Biosystems, EUA) nas seguintes condições: 94 °C, 3 minutos seguidos por 30 ciclos de 94 °C, 30 segundos, 55 °C, 30 segundos, 72 °C 1:20 minutos e um ciclo de extensão de 5 minutos a 72 °C. Os produtos da PCR foram submetidos à precipitação para limpeza do DNA ainda de acordo com instruções do mesmo kit: a cada tubo foram adicionados 2 µl de acetato de amônio 7,5 M, 2 µl de uma solução de glicogênio 10 mg/ml e 30 µl de etanol absoluto gelado. As amostras foram agitadas em vortex, centrifugadas brevemente e incubadas em a -20 °C durante a noite. Em seguida foram centrifugadas a 14000 rpm durante 15 minutos em microcentrífuga (Eppendorf 5415C). O sobrenadante foi descartado e 200 µl de etanol 70% foram adicionados ao DNA precipitado. Novamente os tubos foram submetidos à microcentrifugação durante 5 minutos, 14.000 rpm, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi secado em secadora à vácuo (Speed Vac) durante 5 minutos. Em seguida foram adicionados 8 µl de tampão de amostra ("stop solution"), os tubos foram vigorosamente agitados e centrifugados brevemente para concentrar a amostra. Após um período de aquecimento por 3 minutos a 100 °C as amostras foram esfriadas em gelo e submetidas a seqüenciamento automático de DNA (Alf Express System; GE Healthcare).

5.10.2. Para Megabace (GE Healthcare)

As colônias de bactérias recombinantes foram transferidas para uma placa "deepwell" contendo 1,2 ml do meio meio 2xYT (Bacto-tryptona 16 g, extrato de levedura 10 g, NaCl 5 g pH 7,4, q.s.p 1000 ml de H₂O), IPTG 0,1 M, Ampicilina 100 mg/ ml e X-gal 2%. As

placas foram agitadas por 22 horas, 180 rpm a 37 °C. Constatando que todas as bactérias haviam crescido de maneira satisfatória, uma parte dessa cultura foi adicionada ao mesmo volume de glicerol 50% e em seguida guardada a -80°C. O restante do meio contendo as bactérias foi usado para a extração de plasmídeos (mini-prep), seguindo o protocolo descrito a seguir:

As placas "deep well" foram centrifugadas por 6 minutos, a 4000 rpm, para sedimentar as células. O sobrenadante foi descartado, as placas foram invertidas sobre papel absorvente e foram adicionados 240 µl de GET (9 g de glicose, 20 mL de EDTA 0,5 M pH 8,0, 26 ml de Tris HCl 1M pH 7,4, q.s.p. 1000 ml de H₂O) em cada well sob agitação em vórtex por 2 minutos, para ressuspender as células. As placas foram centrifugadas por 9 minutos a 4000 rpm. Posteriormente, o sobrenadante foi descartado e a placa invertida em papel absorvente por 5 minutos. Em seguida foram adicionados 80 µl de GET e a placa foi agitada. Foram adicionados 2,5 ml de RNase (10 mg/ ml) em cada poço de uma microplaca de 250 µl de propileno de fundo redondo (tipo ELISA) e toda a suspensão de células foi transferida para a mesma. Foram adicionados a cada poço, 80 ml de NaOH 0,2N/ SDS 1% e a mistura foi agitada 30 vezes por inversão e incubada por 10 minutos em temperatura ambiente. Em seguida, foram adicionados a cada poço, 80 ml de KOAc 3M e a mistura foi agitada 30 vezes por inversão. A placa foi incubada por 10 minutos em temperatura ambiente e por 30 minutos em estufa a 90 °C. Logo a seguir a placa foi esfriada em gelo picado por 10 minutos e centrifugada por 9 minutos a 4000 rpm. A placa filtro foi então fixada na placa de fundo V e todo o volume da placa de fundo U foi transferido para a placa filtro através da centrifugação por 6 minutos a 4000 rpm. A placa filtro foi descartada e 100 ml de isopropanol foi adicionado ao filtrado da placa de fundo U, a qual foi misturada 30 vezes por inversão e centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm. O sobrenadante foi descartado e foram adicionados, posteriormente, 190 ml de etanol 70% gelado. Em seguida a placa foi centrifugada por 5 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi descartado, a placa foi invertida

sobre papel absorvente e centrifugada rapidamente a 900 rpm. Após 60 minutos secando a temperatura ambiente, foram adicionados 60 ml de água milliQ e a placa foi deixada a temperatura ambiente por 18 horas. A quantificação do DNA plasmidial purificado foi feita através de eletroforese em gel de agarose 0,8% corado com brometo de etídio em TAE 0,5X por 30 minutos à 80 volts.

Na reação de seqüenciamento das extremidades dos insertos de cDNA nos sentidos direto e reverso, foram utilizados 10 pmoles de cada iniciador (oligonucleotídeo M13- 40 senso: GTCGCCGTCGTTTTAC e M13 antisenso: TCACACAGGAAACAGCTATGAC), 4 ml de Dynamic ET - Dye terminator Kit - MegaBace (GE Helthcare) e aproximadamente 300 ng de DNA, em um volume final de 10 ml. Os ciclos de amplificação foram realizados no termociclador (Eppendorf Mastercycler). O primeiro ciclo da amplificação foi constituído de desnaturação inicial a 95°C por 20 segundos, um passo de anelamento a 50 °C por 15 segundos e um passo de extensão de 1 minuto a 72 °C. Esses passos foram repetidos por 29 vezes.

Os produtos foram mantidos a 4 °C escondidos da luz até que esses passassem por um tratamento que os tornassem aptos a serem seqüenciados pelo MegaBace, o "clean up", descrito a seguir: foram adicionados 1 ml de acetato de amônio 7 µM e 30 ml de etanol absoluto em cada well. A placa foi agitada por 10 segundos e deixada a temperatura ambiente por 20 minutos em ambiente escuro (a fluorescência é fotossensível). Em seguida, a placa foi centrifugada por 45 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi desprezado e foram adicionados 100 ml de etanol 70%. Novamente a placa foi centrifugada por 10 minutos a 4000 rpm, o sobrenadante foi novamente descartado, a placa foi invertida sobre papel absorvente e, finalmente, centrifugada rapidamente a 800 rpm e deixada em temperatura ambiente até que o etanol secasse completamente. Foram adicionados 10 ml de Loading Solution (GE Healthcare) por well, placa foi agitada por 2 minutos e centrifugada rapidamente. A partir deste ponto a placa estava pronta para ser

aplicada no Sequenciador Automático MegaBACE 1000 (GE Healthcare). O sequenciamento durou cerca de 4 horas com a utilização de 2kv para a injeção das amostras por 60 segundos e 6kv para a corrida.

5.10.3. Para ABI PRISM 310 Genetic Analyser (Applied Biosystems, Foster City, CA)

A preparação do DNA plasmidial foi como descrita no item 5.9. A reação de sequenciamento foi feita em microtubos de PCR seguindo o mesmo protocolo como AlfExpress, exceto pelo kit de sequenciamento utilizado: Big Dye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction (Applied Biosystems, Foster City, CA). A reação de PCR foi conduzida em um termociclador Perkin Elmer System 9600 com 25 ciclos: 96 °C por 10 segundos, 50 °C por 5 segundos, 60 °C por 4 minutos e um ciclo final de 4 °C. Posteriormente, 40 µl de isopropanol 75 % (v/v) foram adicionados a cada amostra, sendo incubadas durante 20 minutos no escuro e centrifugadas por 20 minutos a 16000 x g, descartando-se o sobrenadante. Foram adicionados 100µl de etanol 70 % (v/v) ao precipitado, sendo os microtubos centrifugados a 16000 x g por 20 minutos, o sobrenadante removido e as amostras secas à temperatura ambiente no escuro. Em seguida, foram ressuspensas em 10 µl de formamida HiDi (Applied Biosystems, Foster City, CA), desnaturadas a 95°C por 5 minutos e mantidas no gelo até a injeção no equipamento ABI3100 (Applied Biosystems, Forter City, CA).

5.11. Edição das seqüências, pesquisa de similaridade e construção de árvores filogenéticas

5.11.1. Edição das seqüências

O exame final e a edição das seqüências foi feito manualmente de acordo com a seguinte metodologia: as seqüências brutas foram depositadas no banco de dados do programa Vector NTI[®] 10.1 suite (Invitrogen, EUA). As seqüências de cada classe foram depositadas em pastas diferentes nomeadas “GamaBrutas” ou “AlfaBrutas”, e cada seqüência recebeu uma identificação contendo a data do seqüenciamento, o aparelho usado no seqüenciamento e o iniciador e a direção do seqüenciamento (senso ou reverso).

Usando a ferramenta de busca deste programa, as regiões de anelamento dos iniciadores foram localizadas nas seqüências brutas. Foram produzidas as seqüências complemento reverso àquelas em sentido antisenso e as regiões correspondendo ao vetor foram retiradas. As seqüências de cada clone depositado foram alinhadas entre si pelo programa (que emprega o algoritmo Clustal W) para identificação de possíveis erros de seqüenciamento. Após a obtenção de, pelo menos 4 seqüências completas nos sentidos senso e antisenso para cada clone, as seqüências foram transferidas para uma subpasta (nomeadas “GamaEditadas” ou “AlfaEditadas”), onde estavam prontas para a geração dos arquivos fastas utilizados no alinhamento. Após terem sua estrutura primária deduzida, foram também submetidas às predições de massa molecular e ponto isoelétrico, além das predições de modificações pós-traducionais. Um exemplo do esquema utilizado para a edição das seqüências é dado a seguir na Figura 4.

Inibidor: Alfa

Data do sequenciamento: 01/03/07

Serpente: L. muta / Clone: 2 H04 / Iniciador : senso

```
TAGCCGTAGCAGACTTAATTGAGGCGAATGGGCCCTGAGTTACTCNACGGCGCAGTGTGATGGATATCTGCA
GAATTCGCCTTGGAAGGAAAGTACTTTCTCTGGATCCTCATCTAAACAGCAGAAAGCACAGTGTTTAAGATGC
GTCTGATTCTGCTTTCCGGTCTTCTACTTTTGGGAACCTTTCTGGCCAACGGAATGACACAGATCCTGAAGG
ACAAATGCTGAATTCGGTGATTGAATCCGTAATGATACCTCAAAGAGAGTTCGCCAACCTGAAACATGCCTTC
CTGACAGTCCACAAAGCCCGATCCTTTGGGAGTGGCCAGTGAAAAGATTGTATGTGAGCAACAAGGAAATCGG
AAAGTTTTGAAGCTCTCAAAGAGATTTTGTGACCAAGCCGGTGGCCATATCCCTTCCCCTCAATTCGACAAAT
CAGAAACAAGGCCCTTCGCAAAATGTTCTTGGAGAGGCACAACAAAGAAGCCTACCTTGTCGTGGATGACCCACAA
AACTTCACCAACTGGGCTGCGGGACAACCGAATGAGGCTGATGGAACCTGTGTGAAAGCAAGATACACACGGA
TCCTGGCACTCTGCGTCTGTGATGACAACCTCTTTAGTCGTGTGTGAGTTTTTATTTTCATTTTATGAAGGGC
CGAATTCCAGCACACTGGCGGCCGTTACCTAGTGGATCCGAGCTCGGTACCAACGCTTGGCGTAATNCATGGT
CATAGCTGNTTCCTGNTGTGAATTGGTTATCCGTCAACAATTACACACAACATAACGAGCCCGGAAACCTAAAG
TGGTAAGCCTTGGGGTTGCCTATTGAGTTGAGCTAACTCCATTATTGCGTTGNCCACTG
```

Iniciador P2 - C-terminal (TCA TAA AAT GAA ATA AAA CTC ACA CAC GAC)

Iniciador P3 - Sinal (ATG CGT CTA ATT CTG CTG TCC GGT)

Iniciador P1 - 5'UTR (GGA AGG AAA GTA CTT TCT CTG GAG)

Iniciador P4 - Madura (CAT GAG ACA GAT CCT GAC GGA)

Figura 4. Edição das seqüências. Exemplo de uma seqüência bruta como recebida do sequenciador e é depositada no programa Vector NTI suíte 10.1 (Invitrogen). As cores indicam as regiões de anelamento dos iniciadores, as quais são utilizadas como referência para edição das seqüências.

5.11.2. Pesquisa de similaridade e construção de árvores filogenéticas

As árvores filogenéticas para os inibidores foram geradas com as sequências de nucleotídeos, a partir da região do peptídeo sinal. Para estes estudos, as seqüências nucleotídicas editadas manualmente foram submetidas ao BLASTn (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/BLAST>), para busca de similaridade com outros PLIs. Em seguida, as sequências foram alinhadas entre si e com as sequências similares obtidas no GenBank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>).

O alinhamento múltiplo de nucleotídeos dos inibidores foi obtido com o programa ClustalW (Thompson et al., 1994) e um cladograma foi construído com o método de “Neighbour joining”, com o programa MEGA4.0, usando-se o código genético padrão. Para os inibidores da classe alfa, as seguintes seqüências de α PLIs de serpentes não estudadas neste trabalho foram incluídas na análise: ([AB026666](#)), de *Gloydius blomhoffii siniticus* Gloyd 1977 (Viperidae, Crotalinae); ([DQ654241](#) e [DQ654242](#)) de *Atropoides nummifer* Ruppel 1845 (Viperidae, Crotalinae); ([AF54045](#)) de *Bothrops moojeni* Hoge 1966 (Viperidae, Crotalinae) e ([P21755](#)) de *Trimeresurus flavoviridis* (Viperidae, Crotalinae). A seqüência ([AB030247](#)) da espécie *Elaphe quadrivirgata* Boie 1826 (Colubridae, Colubrinae) foi usada como grupo externo. O grau de confiança para os ramos foi determinado pelo método de bootstrap (Felsenstein, 1992).

De maneira semelhante, as seqüências nucleotídicas dos inibidores gama foram usados para geração da árvore filogenética. O programa MrBayes 3.1.2 (Huelsenbeck e Ronquist, 2001) foi usado para inferência bayesiana usando duas corridas independentes para as cadeias de Markov (1 fria e 3 quentes) com 106 gerações e amostragem a cada 100 gerações. Foram “queimadas” as primeiras 25% das árvores, assim como seus parâmetros estimados, para que as cadeias atingissem um estado estacionário.

As seguintes seqüências dos γ PLIs de serpentes do Velho Mundo foram incluídas na análise: ([AB018372](#)), de *Gloydius blomhoffii siniticus* Gloyd 1977 (Viperidae, Crotalinae);

([AF232771](#)), de *Python reticulatus* Schneider 1801 (Pythonidae) e ([AB021425](#)), de *Elaphe quadrivirgata* Boie 1826 (Colubridae). A espécie *P. reticulatus*, foi usada como grupo externo.

5.11.3. Pesquisa de domínios conservados

As seqüências de aminoácidos (sem o peptídeo sinal) dos inibidores foram utilizadas para pesquisa de domínios conservados. Foram utilizadas duas ferramentas:

1- BLASTp utilizando uma seqüência de aminoácidos deduzida sem o peptídeo sinal contra o banco de dados de proteínas do GenBank (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>). Este algoritmo pesquisa por similaridade local em seqüências de proteínas e domínios conservados em todos bancos de dados não redundantes, aos quais é integrado: PDB (<http://www.rcsb.org/pdb/home/>), SwissProt (<http://www.ebi.ac.uk/swissprot/>) e PIR (<http://pir.georgetown.edu/>), entre outros.

2- InterProScan ferramenta que faz uso de diversos aplicativos, como BLAST (<http://www.expasy.org/tools/blast/>), para buscar domínios conservados em bancos de dados integrados, como PROSITE (<http://www.expasy.ch/prosite/>), PRINTS (<http://www.bioinf.manchester.ac.uk/dbbrowser/PRINTS/>), Pfam (<http://pfam.sanger.ac.uk/>), ProDom (<http://prodom.prabi.fr/prodom/>) e SMART (<http://smart.embl-heidelberg.de/>) entre outros (<http://www.ebi.ac.uk/InterProScan/>). A busca foi feita usando parâmetros default.

5.11.4. Análise de estruturas secundárias

Para predição da estrutura secundária foram utilizados três programas diferentes, os quais foram instalados localmente em uma máquina com o sistema operacional Linux e analisados com parâmetros “default”: (1) JNET (<http://www.compbio.dundee.ac.uk/~www-jpred/jnet/>), (2) PSIPRED (<http://bioinf.cs.ucl.ac.uk/psipred/>) e (3) SS-PRO4

(<http://scratch.proteomics.ics.uci.edu/>). As seqüências das proteínas maduras (sem o peptídeo sinal) dos PLIs foram utilizadas como dados de entrada (*input*). Os resultados obtidos com os três diferentes programas foram usados para a construção de um “script”, em linguagem perl, que converteu a saída (*output*) dos três programas em um resultado consenso. Assim, quando havia consenso entre os três diferentes programas de predição, foram usadas letras maiúsculas para discriminá-los (C, E, H, N); quando havia consenso entre dois programas foram usadas letras minúsculas (c, e, h, n) e quando não houve consenso, foi usada a letra “N”.

5.11.5. Análises de modificações pós-traducionais

Na pesquisa de sítios de glicosilação foram usados dois algoritmos que usam redes neurais treinadas em seqüências cujos sítios de glicosilação já foram experimentalmente verificados. Os seguintes algoritmos foram usados com parâmetros default: YinOYang (<http://www.cbs.dtu.dk/services/YinOYang>) na predição de sítios de O-(beta)-GlcNAcilação, e NetNGlyc (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc>) na predição de sítios de N-Glicosilação. Na predição por sítios de fosforilação foi usado o algoritmo NetPhos, o qual pesquisa por sítios potenciais de fosforilação em serina, treonina e tirosina em seqüências de proteínas de eucariotos (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetPhos/>).

5.11.6. Modelagem molecular por homologia

O programa de modelagem molecular por homologia, Modeller9v3 (<http://salilab.org/modeller>) foi utilizado para a geração dos modelos tridimensionais para os inibidores. O Modeller é um programa usado para modelar estruturas 3D de proteínas usando como modelo a estrutura 3D de alguma proteína estruturalmente similar já cristalizada. A escolha desta estrutura 3D-modelo (*template*) é feita através do alinhamento da seqüência-alvo a ser modelada (a *query*) com estruturas relacionadas de proteínas do

banco de dados do PDB (<http://www.wwpdb.org>). O programa então produz automaticamente o modelo 3D da proteína-alvo. Assim, utilizando o tutorial do programa como guia, foram geradas as estruturas 3D dos inibidores alfa e gama. O inibidor alfa foi modelado por homologia a partir da proteína surfactante pulmonar SP-A (identificação no PDB:[1r13](#)) e para o inibidor gama foi utilizada a proteína CD59 (identificação no PDB: [1erg](#)).

Nestes estudos foram utilizadas as seqüências primárias deduzidas, sem o peptídeo sinal. Para inibidores alfa, a estrutura primária da seqüência Lm03- α PLI foi usada como seqüência-alvo. Para modelar as estruturas 3D dos γ PLIs, foram escolhidas as seqüências (aBja_02) como representante dos gama PLIs em geral e a seqüência (aBn_A1) como representante das seqüências contendo a inserção de 4 resíduos de aminoácidos.

Para avaliar as restrições de impedimento estéreo-químico dos aminoácidos nas estruturas 3D obtidas, foram utilizados, além da ferramenta de avaliação do próprio Modeller9v3, o programa PROCHEK (<http://www.biochem.ucl.ac.uk/~roman/procheck/procheck.html>).

5.12. Clonagem e expressão de um α PLI em *E. coli*

A amplificação do cDNA codificador do α PLI de *C. d. terrificus* foi realizada através de PCR com iniciadores sintetizados com base na seqüência de um clone (A4) já completamente seqüenciado. Os iniciadores utilizados (seqüências descritas em Metodologia) foram: MI001: senso, amino-terminal, para proteína madura, contendo sítio para enteroquinase e sítio de restrição para *KpnI*, e CON 67: antisenso, carboxi-terminal com sítio de restrição para *HindIII*. Cada reagente utilizado na reação de amplificação foi adicionado da seguinte forma: 8,0 μ l de tampão 5X; 6,6 μ l de dNTPs (2,5 mM); 0,81 μ l de iniciador senso (20 pM); 0,41 μ l de iniciador antisenso (20 pM); 0,21 μ l de Taq DNA Polimerase; 22,77 μ l de H₂O MilliQ; 1,2 μ l de DNA (140 pg). O volume total foi de 40,0

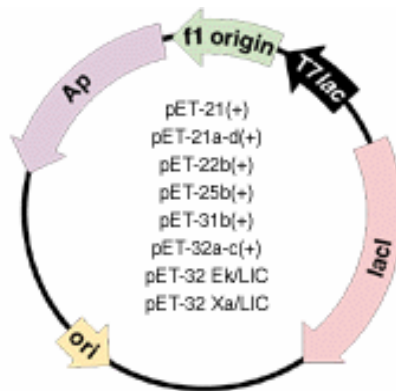
μl. O DNA amplificado foi analisado em gel de agarose a 1% e purificado do gel com kit comercial apropriado (Gel Band Purification Kit, GE Healthcare). A concentração do produto de PCR purificado foi estimada em espectrofotômetro.

5.12.1. Digestão enzimática do inserto e vetor pET-32c(+)

Os genes clonados no vetor *pET 32c (+)* estão sob o controle de sinais de transcrição e tradução do bacteriófago T7 (T7 promoter). O vetor possui um gene de resistência à ampicilina, uma cauda de poli-histidina, uma “Tag” correspondente ao N-terminal da tiorredoxina e dois sítios de protease, um para enteroquinase e outro para trombina (Manual pET System, Novagen). O fragmento de DNA a ser usado como inserto e o vetor plasmidial foram digeridos com as enzimas de restrição *HindIII* e *KpnI*. Quinze microgramas do inserto (50 μl) foram adicionados a um microtubo contendo 6 μl da enzima *HindIII* (20.000 U/ml), 7 μl de tampão NEBuffer2 (10 X concentrado) e 7 μl de H₂O MilliQ. Em outro microtubo foram adicionados 3 μl do pET-32c(+) (15 μg), 6 μl de *HindIII* (20.000 U/ml), 3 μl de tampão NEBuffer 2 (10 X concentrado) e 18 μl de H₂O MilliQ. Foi realizado um controle da reação colocando-se para incubação a mesma quantidade do vetor sem a enzima de restrição. A mistura de reação foi incubada a 37 °C por 24 horas. Em seguida as reações foram incubadas a 65 °C por 20 minutos para a inativação da enzima *HindIII*.

Para a realização da digestão pela enzima *KpnI*, as amostras contendo o vetor e inserto previamente digeridos pela enzima *HindIII* foram incubados a 37 °C por aproximadamente 18 horas, na presença de 3 μl de tampão NEBuffer 2 (10 X), 0,5 μl de BSA (10 mg/ml) e 6 μl de *KpnI* (10.000 U/ml). Novamente um controle da reação foi realizado colocando o mesmo valor inicial de vetor íntegro para a digestão com a enzima *KpnI*, como também uma amostra contendo apenas o vetor íntegro sem enzima.

A



B

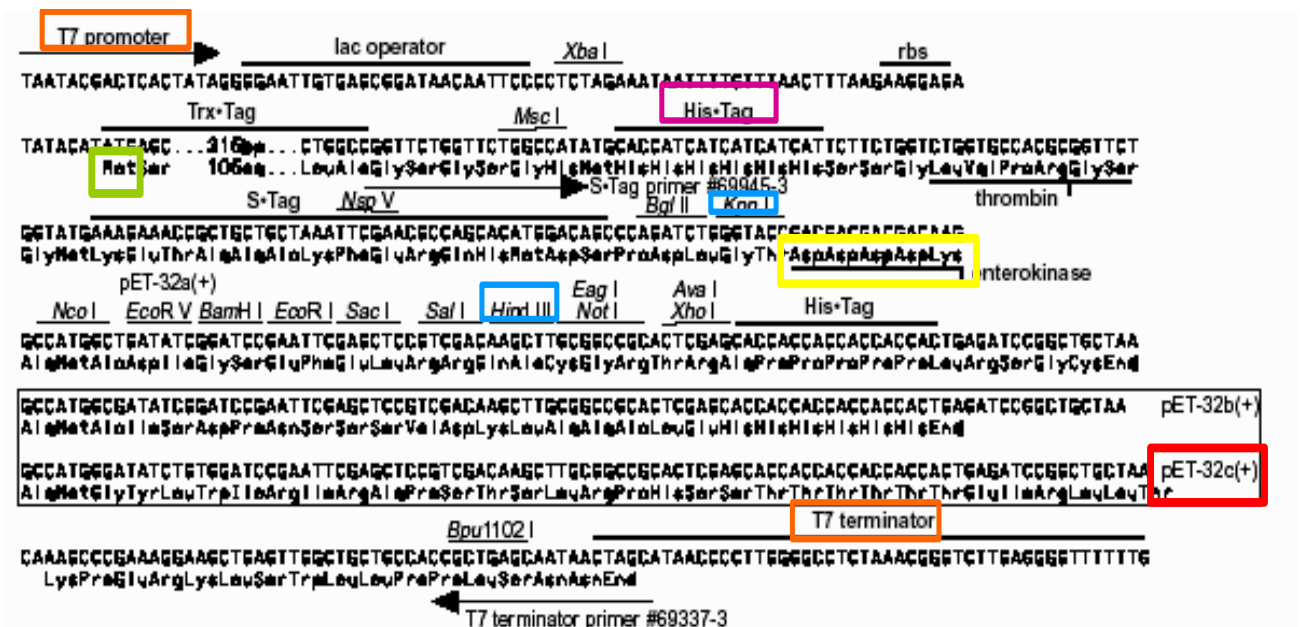


Figura 5. O vetor pET-32c(+). (A) mapa de um plasmídeo pET-32c(+) e (B) a região de clonagem e expressão, com diferença de uma base no sítio de clonagem. Também estão destacados em cores os seguintes sítios:

- pET-32c(+)
- “T7 promoter” e “T7 terminator”
- Cauda poli-histidina
- Sítio de restrição para *HindIII* e *KpnI*
- Metionina
- Sítio de enteroquinase

5.12.2. Purificação das amostras digeridas

Após certificação da digestão em gel de agarose, o inserto e o vetor pET-32c(+) digeridos foram purificados separadamente utilizando-se um kit comercial seguindo as instruções do fabricante. Foram utilizadas duas colunas GEX (GE Healthcare, EUA), uma para purificação do vetor e outra para o inserto, sendo cada uma dessas colunas colocadas em um tubo coletor. Quinhentos microlitros do tampão de captura foram adicionados a cada amostra. Para a primeira coluna, foram transferidos 30 µl da solução contendo o vetor e para a segunda coluna, foram transferidos 90 µl da solução contendo o inserto. Depois de homogeneizadas, as amostras foram centrifugadas a 13.000 rpm por 30 segundos (centrífuga SORVALL). O eluato em cada tubo foi descartado e cada coluna recolocada em seu respectivo tubo coletor. Foram adicionados 500 µl do tampão de lavagem em cada coluna e as amostras foram centrifugadas por mais 30 segundos. Os tubos foram descartados e cada coluna foi transferida para um microtubo novo de 1.5 ml. Cinquenta microlitros de TE foram adicionados a cada coluna. As amostras foram incubadas por um minuto a temperatura ambiente e em seguida, centrifugadas por um minuto. As colunas foram descartadas e o DNA de cada solução foi mensurado em espectrofotômetro.

5.12.3. Ligação vetor - inserto

Para a ligação do inserto CdtA4- α PLI ao vetor, foram testadas duas proporções diferentes de vetor digerido/inserto digerido com a enzima T4DNA ligase. As misturas de reação foram as seguintes:

- 1) Tubo1: 250 ng de DNA do vetor, 150 ng de inserto, tampão 10X, T4 DNA ligase 360U, BSA 2,8 µL, H₂O qsp 20 µl (razão vetor/inserto 1: 6);

2) Tubo 2: 250 ng de DNA do vetor, 500 ng de inserto, tampão 10X, T4 DNA ligase 360U, BSA 2,8 µl, H₂O qsp 20 µl (razão vetor/inserto 1: 20);

Paralelamente foi feito uma reação controle, sem enzima. As reações foram incubadas a 16 °C por 16 horas.

5.12.4. Transformação bacteriana

O DNA plasmidial recombinante pET32-CdtA4, foi transformado em células competentes BL21(DE3)LysS, conforme descrito no item 5.8.

5.12.5. Seleção de clones prováveis recombinantes

Possíveis colônias recombinantes foram tomadas aleatoriamente e inoculadas em 2 ml de meio LB contendo 2 µl de ampicilina (100 µg/ml) em tubos plásticos de 15 ml. As culturas líquidas foram incubadas a 37 °C por 20 horas sob agitação a 200 rpm. Posteriormente foi realizada a purificação dos plasmídeos possivelmente recombinantes e a mensuração dos mesmos em espectrofotômetro. Esses DNAs foram utilizados como molde em uma reação de PCR, com o par de iniciadores P4/P2, objetivando amplificar uma porção interna do inserto.

5.12.6. Expressão da proteína recombinante CdtA4-αPLI induzida em pET32(c+)

As células de expressão BL21(DE3)pLysS já transformadas com os clones recombinantes, foram inoculadas em 10 ml de meio 2xTY/ampicilina e incubadas a 37°C sob agitação, até apresentarem absorvância na faixa entre 0,4 a 0,6 em comprimento de onda de A_{600nm}. Dessa cultura foi recolhido 1 ml, em microtubo de 1,5 ml, o qual foi centrifugado a 10.000

rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado, o *pellet* foi ressuspensionado em 150 µl de tampão de amostra para SDS-PAGE 2X concentrado (25% de tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 20% de glicerol, 40% de SDS 10% p/v, 5% de azul de bromofenol a 0,2%) e congelado a -20°C. Este material foi usado como controle da síntese de expressão gênica bacteriana antes da indução. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG para uma concentração final de 1 mM e retomada a incubação.

Para acompanhamento da expressão foram retiradas alíquotas de 1 ml da cultura bacteriana em intervalos consecutivos de 1 hora até 5 horas após a indução. Todas as alíquotas receberam o mesmo tratamento descrito anteriormente para o controle e foram analisadas por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.

5.12.7. Análise de proteínas recombinantes por eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As eletroforeses em gel de poliacrilamida foram realizadas em condições desnaturantes, na presença de SDS segundo o método de Laemmli (1970). A partir de uma solução de acrilamida-bisacrilamida na relação (A:B) 48:1,5% em água, preparou-se o gel de separação a 21,5 % contendo 41,7 % da solução: 25 % Tris-HCl 1,5 M pH 8,8, SDS 1% p/v, 7% de persulfato de amônio a 10% p/v, 0,07% de TEMED v/v. Após a polimerização do gel de separação, foi preparado o gel de concentração a 4 % contendo 13 % da mesma solução AB, 25 % de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 1 % de SDS 10 % p/v, 7% de persulfato de amônio a 10%, 0,14 % de TEMED v/v.

As amostras de proteína foram preparadas em tampão de amostra para SDS-PAGE 2 X concentrado (25 % de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8, 20% de glicerol, 40% de SDS 10% p/v, 5 % de azul de bromofenol a 0,2 %), como descrito anteriormente. A eletroforese foi conduzida

sob tensão de 120 V à temperatura ambiente em tampão de corrida contendo Tris-glicina 0,02 M e SDS 0,1 % p/v, até que o azul de bromofenol atingisse o limite inferior do gel.

Os géis foram revelados por coloração com azul de coomassie, da seguinte forma: os géis foram imersos na solução corante (Azul brilhante de Coomassie 12,5 g, metanol 225 ml, ácido acético 45 ml, H₂O 225 ml) por 30 minutos, sob agitação suave e transferidos para uma imersão em solução descorante (30 % etanol, 10% ácido acético) onde permaneceram até atingirem a coloração desejada.

5.12.8. Determinação da solubilidade da proteína recombinante induzida

A cultura bacteriana foi incubada por 4 horas após a indução. Após esse período foi retirada uma alíquota da cultura induzida (1 ml), a qual foi centrifugada a 10.000 rpm por 1 minuto. O sobrenadante foi descartado e o precipitado ressuscitado em 150 µl de tampão da amostra para SDS-PAGE 2 X concentrado (como descrito anteriormente) e utilizada como controle. As células do restante da cultura, cerca de 8 ml, foram coletadas por centrifugação a 3.000 rpm durante 15 minutos a temperatura ambiente. O sobrenadante foi desprezado e o precipitado ressuscitado em 1/10 do volume inicial em tampão de lise (Tris-HCl 50 mM pH 8,0, EDTA 2 mM). Lisozima para uma concentração final de 100 µg/ml foi adicionada, assim como 1/10 do volume inicial de 1 % de Triton[®] X-100. Após incubação da mistura a 30 °C durante 15 minutos, esta foi imersa em banho de gelo e sonicada em potência máxima com micro-ponteira, 3 vezes de 5 minutos com intervalos de 10 minutos entre cada procedimento. Em seguida, a amostra foi centrifugada a 12.000 rpm durante 15 minutos a 4 °C. O sobrenadante e o precipitado foram separados em 150 µl de tampão SDS-PAGE 2X e congelados a -20 °C.

5.12.9. Indução de expressão protéica em maior escala

Uma colônia de células BL21(DE3)pLysS foi isolada de uma placa de LB/agar/amp, inoculada em 5 ml de 2XYT/ampicilina e incubada por cerca de 18 horas a 37 °C sob agitação. Essa pré-cultura foi inoculada em 500ml do mesmo meio, o qual foi incubado sob agitação a 37 °C até absorvância igual a 0,5 em comprimento de onda de 600nm. Foi removido 1 ml da cultura para controle de amostra não induzida. Ao restante da cultura foi adicionado IPTG para concentração final de 1 mM. Após incubação por 2 horas e 30 minutos a 37 °C sob agitação, a cultura induzida foi transferida para garrafa de centrífuga de 250 ml previamente resfriada, mantida em banho de gelo por 15 minutos e centrifugada a 3000 rpm por 20 minutos a 4 °C.

O precipitado foi ressuspendido em 10 ml do tampão usado no processo de purificação em tubo de poliestireno de 25 ml. A suspensão foi mantida em banho de gelo por 30 minutos. Em seguida foi congelada a -20 °C e descongelada rapidamente em banho de gelo e o material submetido à sonicação por cerca de 8 X de 15 segundos até ser eliminada a viscosidade do meio. O material foi então centrifugado a 12.000 rpm por 20 minutos a 4°C. O sobrenadante e o precipitado foram separados e armazenados a 4 °C até o momento da purificação.

5.12.10. Purificação da proteína recombinante induzida

A) Do sobrenadante da cultura bacteriana

A proteína recombinante induzida expressa no sobrenadante da cultura bacteriana foi purificada por cromatografia de quelação de metal através da coluna HiTrap Chelating (GE Helthcare, EUA) em sistema HPLC. A coluna foi carregada com 5 ml de solução de NiSO₄ 0,1 M, lavada com 10 ml de água e equilibrada com 5 ml de tampão inicial 0,2 M

(Na_2HPO_4 , NaCl 0,5 M e imidazol 0,01 M). Foram aplicados 0,6 ml do sobrenadante em tampão inicial, seguidos de 10 ml do mesmo tampão. As proteínas ligadas foram eluídas com 10 ml do tampão de eluição (Na_2HPO_4 0,02 M, NaCl 0,5 M e imidazol 0,5 M). Foram recolhidas frações de 1 ml a partir da aplicação da amostra. A cromatografia foi acompanhada pela absorvância das frações em comprimento de onda de 280 e 254nm. No final da eluição a coluna foi lavada com 10 ml de água e reequilibrada com tampão inicial para aplicação de nova amostra. A cada duas cromatografias a coluna era novamente carregada com solução de níquel.

B) Do precipitado da cultura bacteriana

A proteína induzida presente no precipitado da cultura bacteriana foi purificada pelo mesmo método descrito anteriormente: o precipitado obtido da cultura bacteriana induzida foi ressuspenso em 20 ml de tampão inicial. A suspensão foi sonicada por cerca de 2 minutos em banho de gelo e centrifugada por 15 minutos a 15.000 rpm a 4°C. O precipitado obtido foi ressuspenso no mesmo tampão e centrifugado novamente. Esse precipitado foi ressuspenso em tampão inicial 1X contendo guanidina-HCl 6 M e incubado por 1 hora a 37 °C. O material foi centrifugado a 18.000 rpm por 20 minutos para remoção de material insolúvel, e o sobrenadante filtrado em Millex 0,45 µm. Posteriormente foram seguidas as mesmas etapas como para a purificação de proteína recombinante induzida expressa no sobrenadante.

5.13. Purificação de uma miotoxina K49-PLA₂ do veneno de *Bothrops jararacussu*

A mais conhecida fosfolipase A₂ miotóxica do veneno de *B. jararacussu*, a bothropstoxina I (Btx-I) foi purificada através de cromatografia convencional e HPLC, de acordo com a metodologia descrita por Homsí-Brandeburgo e cols. (1987), com modificações. A

primeira etapa consistiu em cromatografia convencional de gel filtração em Sephacel G-75. O pico de interesse foi então aplicado a uma coluna de troca iônica (HiTrap SP XL, 1 ml) em sistema HPLC (Akta Purifier 10, GE Healthcare). As frações contendo Btx-I foram reunidas e uma alíquota foi aplicada a uma coluna de fase reversa (Sephasil-Peptide C18 5u ST 4.16/250) com fins analíticos.

5.14. Purificação de α PLI recombinante em coluna de afinidade sepharose-PLA₂

5.14.1. Preparo da coluna de afinidade bothropstoxina Btx1-Sepharose

Em um tubo de 50 ml foram pesados 5g de Sepharose-4B ativada com brometo de cianogênio (Sigma) (segundo informativo do fabricante, 1 mg produz 3,5 ml de gel) os quais foram hidratados com 40 ml de HCl 1mM (200 ml em 5 alíquotas de 40 ml cada). A resina foi então centrifugada por 5 minutos a 3000 rpm a 4 °C. O sobrenadante foi cuidadosamente retirado e o volume foi novamente levado a 40 ml com a solução anterior. Este procedimento foi repetido por mais 3 vezes. Em seguida, foram realizadas mais 2 lavagens com tampão de ligação (NaHCO₃ 0,1 M pH 8,3 contendo 0,5 M de NaCl).

Uma pequena quantidade de tampão foi deixada e o ligante (30 mg de bothropstoxina I) foi rapidamente adicionado. O gel foi agitado lentamente por 2 horas à temperatura ambiente, mais 14 horas a 4 °C e centrifugado a 3000 rpm durante 5 minutos. Para avaliar se a ligação foi efetivada, uma alíquota do sobrenadante foi medida em espectrofotômetro, em comprimento de onda A_{280nm}. Após verificação da ligação Btx1-sepharose, possíveis grupos reativos foram bloqueados por meio de incubação, durante 2 horas à temperatura ambiente e sob agitação suave, com 20 ml de glicina 0,2 M pH 8,0 contendo NaCl 0,5 M. Finalmente o gel foi centrifugado (desprezando-se o sobrenadante) e lavado alternadamente com tampão acetato 0,1 M pH 4,0 contendo 0,5 M de NaCl para abaixar o

pH e tampão carbonato 0,1 M pH 8,3 contendo 0,5 M de NaCl para aumentar. O último tampão foi o de acoplamento (tampão carbonato). Em seguida, a resina foi lavada duas vezes (20 ml cada) com PBS.

5.14.2. Cromatografia em coluna de afinidade Btx1-Sepharose

O sobrenadante obtido da cultura líquida de bactérias foi utilizado para purificação de Cdt- α PLI recombinante em coluna de afinidade (item anterior), conforme a seguinte metodologia: 1 ml de cultura diluída 1:3 com PBS foi incubado com a resina durante à noite, a 4 °C e sob agitação suave. A coluna (contendo cerca de 17 ml de gel) foi lavada com PBS até que a absorvância atingisse zero em comprimento de onda $A_{280\text{nm}}$. Em seguida, a proteína recombinante retida foi eluída com tampão glicina-HCl (glicina-HCl 0,1 M contendo NaCl 0,15 M pH 2,8). A coluna então foi lavada por cerca de 2 vezes seu volume com PBS contendo 0,5 M de NaCl e novamente com PBS por 5 vezes seu volume, antes de nova aplicação de amostra.

6. RESULTADOS

A prospecção realizada para os inibidores das classes alfa e gama será apresentada em dois tópicos separados para facilitar a compreensão.

6.1. Prospecção de inibidores da classe alfa

Nessa seção mostramos os resultados obtidos da prospecção de proteínas similares aos inibidores α PLI para cada espécie de serpente brasileira estudada, utilizando as seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos. Foram geradas seqüências completas de quatro clones para as espécies *B. jararaca* (02, 06, 07, 10), *B. jararacussu* (01, 05, 07, 11), *B. neuwiedi* (A1, 06, 08, 11) e *C. d. terrificus* (A4, A5, B1, B4); cinco clones para *B. alternatus* (03, 06, 08, 10, 14) e *L. muta* (02, 03, 06, 07, 09); seis clones para *B. erythromelas* (02, 04, 08, 10, 12, 14) e *B. moojeni* (03, 04, 05, 08, 10, 12).

Todas as 38 novas seqüências de α PLIs foram depositadas no Genbank® (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Genbank/index.html>) e seus números de acesso foram listados na Tabela 7.

6.1.1. RT-PCR de amostras de tecido hepático de serpentes

A qualidade dos RNAs extraídos de tecido hepático das serpentes foi analisada por eletroforese em gel de agarose, conforme exemplificado na Figura 6. Apenas as amostras que apresentaram duas bandas claramente visíveis e distintas de 28 S (4,7 – 5 Kb) e 18 S (1,95-2,1 Kb), correspondentes à RNA ribossomal livre de degradação, foram utilizadas. Quando necessário, a extração de RNA foi repetida com nova amostra de tecido hepático.

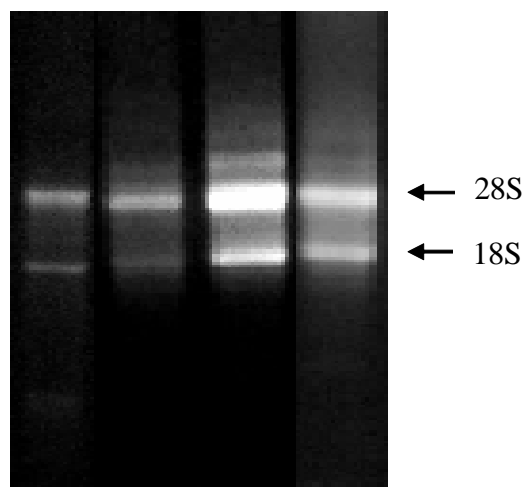


Figura 6. Gel agarose a 1% para avaliar a integridade do RNA. Duas bandas de RNAs ribossomais 28S (4,7 – 5 Kb) e 18S (1,95-2,1 Kb) são claramente visíveis e distintas (setas à direita).

6.1.2. Detecção de cDNA codificador de α PLIs

Após a síntese da primeira fita com oligodT, os cDNAs foram amplificados com iniciadores específicos para a classe alfa P1/P2 (5'UTR/ carboxi-terminal) ou P4/P2 (proteína madura/carboxi-terminal).

Foram encontrados produtos de amplificação dos tamanhos 415 pb e 730 pb para o inibidor alfa (Figura 7) correspondendo aos tamanhos compatíveis com os segmentos 5'UTR/carboxi-terminal e amino-terminal (proteína madura)/carboxi-terminal de cada α PLI. Estes resultados confirmam a presença α PLIs nas espécies *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *C. d. terrificus* e *L. muta*.

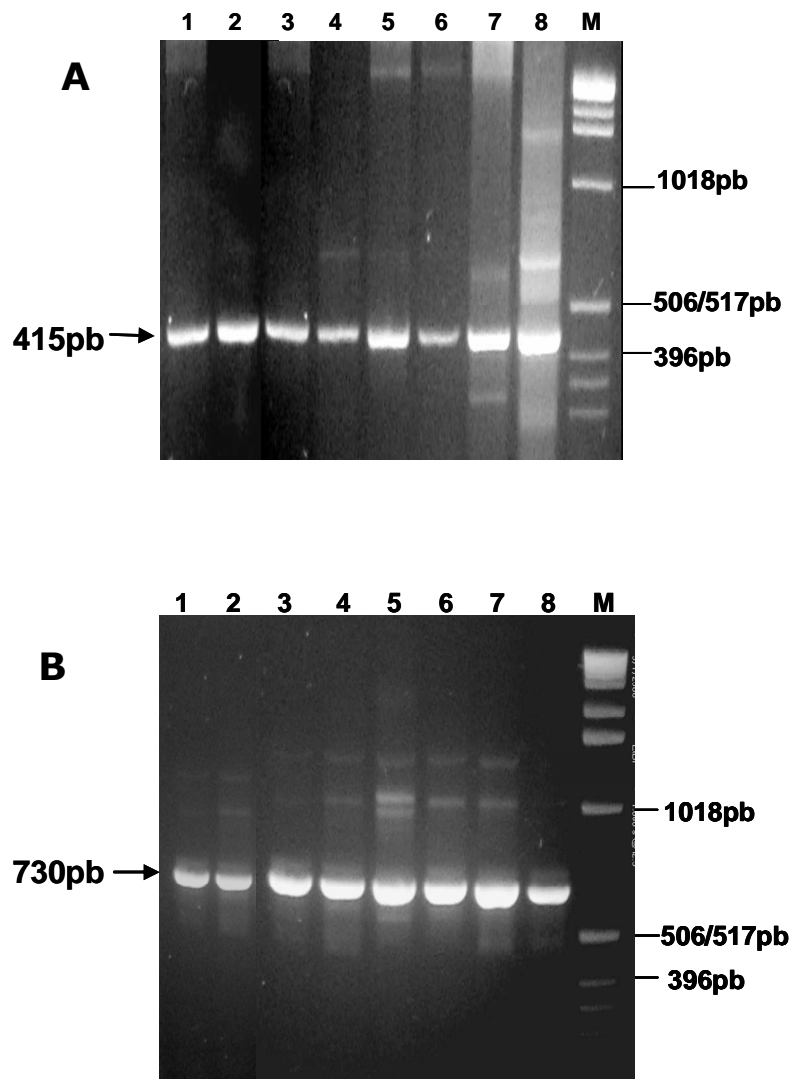


Figura 7. Eletroforese em gel de agarose a 1% dos produtos de amplificação dos cDNAs codificadores dos inibidores alfa. Em “A” foram usados os iniciadores P4/P2 (proteína madura/carboxi-terminal) e em “B”, iniciadores P1/P2 (5’UTR/carboxi-terminal). 1. *C. d. terrificus*; 2. *L. muta*; 3. *B. alternatus*; 4. *B. erythromelas*, 5. *B. jararaca*; 6. *B. jararacussu*; 7. *B. moojeni*; 8. *B. neuwiedi*; M. padrão de massa molecular 1kb.

6.1.3. Clonagem e sequenciamento dos cDNAs em vetores plasmidiais

Os produtos amplificados das PCRs (item 6.1.2) foram analisados em gel de agarose (Figura 7) e utilizados para clonagem em vetores plasmidiais do tipo TA. Em seguida, os clones recombinantes positivos foram submetidos ao sequenciamento. Foram geradas sequências completas de, pelo menos, quatro clones para cada espécie estudada.

As seqüências obtidas foram editadas manualmente e, em seguida, foram submetidas ao BLASTn, para busca de similaridade com PLIs de outras serpentes. As seqüências similares resultantes do BLASTn foram utilizadas nos alinhamentos para comparação. A seqüência do α PLI ([AB026666](#)) de *Gloydius blomhoffii siniticus*, uma serpente Crotalinae, foi usada como referência por ser a única serpente conhecida em que à época do início do nosso trabalho, apresentava seqüências das três classes de inibidores depositadas no Genbank. A seqüência do α PLI ([AB030247](#)) de *Elaphe quadrivirgata* (família Colubridae) foi utilizada como grupo externo na construção da árvore filogenética. Resultados dos alinhamentos das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos deduzidos, a partir do peptídeo sinal, são mostrados nas Figuras 8 e 9, respectivamente.

G.b.siniticus|ABO26666 ATGCGTCTGATTCTGCTGTCCAGTCTTCTTCTCTTGGGAACCTTTCTGGCCAACGGACATGAGACAGATCCTGATGGGCATGTGCTGAATTCATTGATGCTAATTGTAATGAGACTTCAAAGAGAGTTC [129]
B.alternatus_10|EU421904C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.AT.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.alternatus_14|EU421905C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.AT.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.alternatus_03|EU421901C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.AT.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.alternatus_08|EU421903C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.AT.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.alternatus_06|EU421902C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.AT.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.erythromelas_08|EU421908C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.erythromelas_10|EU421909C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.erythromelas_04|EU421907C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC.....G... [129]
B.erythromelas_12|EU421910C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.erythromelas_14|EU421911C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.erythromelas_02|EU421906C.....T...G.....T.....T.....T.....C.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.neuwiedi_06|EU421927C.....T...G.....T.....T.....T.....ACA.....AA.A.....G.....TGATGCCC.....GAT..... [129]
B.neuwiedi_08|EU421928C.....T...G.....T.....T.....G.T.....ACA.....AA.A.....G.....TGATGCCC.....GAC..... [129]
B.jararaca_02|EU421912C.....T.....T.....T.....T.....C.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.jararaca_10|EU421915C.....T.....T.....T.....T.....C.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.jararaca_07|EU421914C.....T.....T.....T.....T.....C.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.jararaca_06|EU421913C.....T.....T.....T.....T.....C.....ACA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.jararacussu_01|EU421916C.....T...G.....T.....T.....T.....C.....G...AGT.....CA.AA.AC.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.jararacussu_07|EU421918C.....T...G.....T.....T.....T.....C.....G...AGT.....CA.AA.AC.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.neuwiedi_11|EU421929C.....T...G.....T.....T.....T.....C.....G...AGT.....CA.AA.AC.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.jararacussu_11|EU421919C.....T...G.....T.....T.....T.....C.....G...AGT.....CA.AA.AC.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.neuwiedi_A1|EU421926C.....T...G.....T.....T.....T.....G...AGT.....G...A...AA.A...G.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.jararacussu_05|EU421917C.....T.....G.....T.....T.....T.....AGA.....AA.A.....TGATGCCC.....CAC..... [129]
B.moojeni_03|EU421920C.....T.....T.....T.....T.....AGA.....AA.A.....TGAT.CCC.....CAC.....A.CT..AT [129]
B.moojeni_12|EU421925C.....T.....T.....T.....T.....AGA.....AA.A.....TGAT.CCC.....CAC.....A.CT..AT [129]
B.moojeni_10|EU421924C.....T.....T.....T.....T.....AGA.....AA.A.....TGAT.CCC.....CAC.....A.CT..AT [129]
B.moojeni_04|EU421921C.....T.....T.....T.....T.....AGA.....AA.A.....TGAT.GCC.....CAC..... [129]
B.moojeni_05|EU421922C.....T.....T.....T.....T.....G...G...AGT.....C.AA.A.....TTATGGC.....CAC..... [129]
B.moojeni_08|EU421923C.....T.....T.....T.....T.....G...AGT.....C.AA.A.....TTATGGC.....CAC..... [129]
L.muta_02|EU421934C.....T...G...A...T.....T.....C.....C.....A...A...AA.....GG...TGA.TCC.....T..... [129]
L.muta_03|EU421935C.....T...G...A...T.....T.....C.....C.....A...A...AA.....GG...TGA.TCC.....T..... [129]
L.muta_06|EU421936C.....T...G...A...T.....T.....C.....C.....A...A...AA.....GG...TGA.TCC.....T..... [129]
L.muta_07|EU421937C.....T...G...A...T.....T.....C.....C.....A...A...AA.....GG...TGA.TCC.....T..... [129]
L.muta_09|EU421938C.....T...G...A...T.....T.....C.....C.....A...A...AA.....GG...TGA.TCC.....T.....A..... [129]
C.d.terrificus_A4|EU421930C.....T...G.....T.....T.....T.....TG.....G...AG.A.....GG...T...T...C.T...A.....A..... [129]
C.d.terrificus_A5|EU421931C.....T...G.....T.....T.....T.....TG.....G...AG.A.....GG...T...T...C.T...A.....A..... [129]
C.d.terrificus_B1|EU421932C.....T...G.....T.....T.....T.....TG.....G...AG.A.....GG...T...T...C.T...A.....A..... [129]
C.d.terrificus_B4|EU421933C.....T...G.....T.....T.....T.....TG.....G...AG.A.....GG...T...T...C.T...A.....A..... [129]
A.nummifer|DQ657242.1C.....T...G.....T.....T.....T.....G...A...T...C.TA.AA.....GA...TGA.GC.....T.....T... [129]
A.nummifer|DQ657241.1C.....T...G.....T.....T.....T.....G...A...T...C.TA.AA.....GA...TGA.GCC.....T.....T... [129]
T.flavoviridis|D87548.1C.....A.....G.....T.....T.....T.....G.....C...A...A...A...G...GA...TGA...CCC...TTT...A...AT [129]
E.quadrivirgata|AB030247AG...C.....T.....T.....CTA.C.....A...G...C.....A...A...AA.A...T...G.TGA...C...CGGC...G.G.A.A...A.A [129]

G.b.siniticus TCCAACCTGAAAGATGGCTTCCTGACAGTCCACAAAGCCCGATCCTTTGGGAGTGGCAGTGAAGATTGTACGTGACCAACAAGGAAGTCGGGAACCTTGAAGGTCTCGGAGAAATTTGTGCGCAAGCC [258]
B.alternatus_10 G...A...G...G...C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA...C.G...C...GAG..... [258]
B.alternatus_14 G...A...G...G...C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA...C.G...C...GAG..... [258]
B.alternatus_03 G...A...G...G...C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA...C.G...C...GAG..... [258]
B.alternatus_08 G...A...G...G...C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA...C.G...C...GAG..... [258]
B.alternatus_06 G...A...G...GC.C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA...C.G...C...GAG..... [258]

B.erythromelas_08 G...A...G..G..C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.erythromelas_10 G...A...G..G..C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.erythromelas_04 G...A...G..G..C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.erythromelas_12 G...A...G..G..C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.erythromelas_14 G...A...G..G..C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.erythromelas_02 G...A...G..G..C.....T.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.neuwiedi_06 G...A...G..G..C.....T.....A.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 B.neuwiedi_08 G...A...G..G..C.....T.....A.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 B.jararaca_02 G.....G..G..C.....T.....A.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.jararaca_10 G.....G..G..C.....T.....A.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.jararaca_07 G.....G..G..C.....T.....A.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.jararaca_06 G.....G..G..C.....T.....A.....A.....A...AAA.....C...GA..C.G..C...GAG..... [258]
 B.jararacussu_01 G.....G.TC.....T.....A.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG.....T [258]
 B.jararacussu_07 G.....G.TC.....T.....A.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG.....T [258]
 B.neuwiedi_11 G.....G.TC.....T.....A.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG.....T [258]
 B.jararacussu_11 G.....G.TC.....T.....A.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAGA.....T [258]
 B.neuwiedi_A1 G...A.....G.TC.....T.....A.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG.....T [258]
 B.jararacussu_05 G.....G.TC.....T.....A.....G.....A.....A...AAA.....C...A...C.C...GAGA.....T [258]
 B.moojeni_03 G.....T..TC.....G.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 B.moojeni_12 G.....T..TC.....G.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 B.moojeni_10 G.....T..TC.....G.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 B.moojeni_04 G.....C.....G.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 B.moojeni_05 G.....G..C.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 B.moojeni_08 G.....G..C.....G.....A.....A...AAA.....C...A..C.G..C...GAG..... [258]
 L.muta_02 G.....C..C.....T..G.....A...A..G.....C...AA..G.....GA..... [258]
 L.muta_03 G.....C..C.....T..G.....A...A..G.....C...AA..G.....GA..... [258]
 L.muta_06 G.....C..C.....T..G.....A...A..G.....C...AA..G.....GA..... [258]
 L.muta_07 G.....C..C.....T..G.....A...A..G.....C...AA..G.....GA..... [258]
 L.muta_09 G.....C..C.....T..G.....A...A..G.....C...AA..G.....GA..... [258]
 C.d.terrificus_A4 A.....TTCC...C.....G.....A...AAA.....C...AA..TC.....AAG..... [258]
 C.d.terrificus_A5 A.....TTCC...C.....G.....A...AAA.....C...AA..TC.....AAG..... [258]
 C.d.terrificus_B1 A.....TTCC...C.....G.....A...AAA.....C...AA..TC.....AAG..... [258]
 C.d.terrificus_B4 A.....TTCC...C.....G.....A...AAA.....C...AA..TC.....AAG..... [258]
 A.nummifer|DQ657242.1 G.....G.T..C...A.....T.....G.....A.T..G.....A.....A..... [258]
 A.nummifer|DQ657241.1 G.....G.C..C...GA.....C.....C.....A.T..G.....A.....A..... [258]
 T.flavoviridis|D87548.1 G.....G.T..C...A.....A.....T.....G.....A...AAA.CG.....CC...AA..G.....GAGG..... [258]
 E.quadrivirgata GA...GG..G..A...CT..T.....G...T.....A.....A.....C...A.....C.G..A..A.C.CA...GT..... [258]

300

350

G.b.siniticus GGGGGCCGTATCCCTTCCCTCAACTCAAAAATCAGAACAAGGCCTTCGCAAATGTTCTGAGAGGCACAACAAGAAGCCTACCTTGTCGTTGGGTAAGTCAAGCAAACTTACCAACTGGGCTGAGGGA [387]
 B.alternatus_10A.....G.....T.....G.....C..... [387]
 B.alternatus_14A.....G.....T.....G.....C..... [387]
 B.alternatus_03A.....G.....T.....G.....C..... [387]
 B.alternatus_08A.....G.....T.....G.....C..... [387]
 B.alternatus_06A.....G.....T.....G.....C..... [387]
 B.erythromelas_08A.....G.....T.....T.....G.....C..... [387]
 B.erythromelas_10A.....G.....T.....T.....G.....C..... [387]
 B.erythromelas_04A.....G.....T.....T.....G.....C..... [387]
 B.erythromelas_12A.....G.....T.....T.....G.....C..... [387]
 B.erythromelas_14A.....G.....T.....T.....G.....C..... [387]
 B.erythromelas_02A.....G.....A.T.....T.....G.....C..... [387]
 B.neuwiedi_06 .A.....A.....G.....GG.....T.....G.....C..... [387]

B.neuwiedi_08 .A....A.....G.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.jararaca_02 .A....A.....G.....T.....GG.....T.....T.....G.....C.... [387]
 B.jararaca_10 .A....A.....G.....T.....GG.....T.....T.....G.....C.... [387]
 B.jararaca_07 .A....A.....G.....T.....A.....GG.....T.....A.....G.....C.... [387]
 B.jararaca_06 .A....A.....G.....T.....GG.....A.....T.....G.....C.... [387]
 B.jararacussu_01 .AT..A.....G.....T.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.jararacussu_07 .AT..A.....G.....T.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.neuwiedi_11 .AT..A.....G.....T.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.jararacussu_11 .AT..A.....G.....T.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.neuwiedi_A1 .AT..A.....G.....T.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.jararacussu_05 .AT..A.....G.....T.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.moojeni_03 .A....A.....G.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.moojeni_12 .A....A.....G.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.moojeni_10 .A....A.....G.....GG.....T.....G.....CA... [387]
 B.moojeni_04 .A....A.....G.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.moojeni_05 .A....A.....G.....GG.....T.....G.....C.... [387]
 B.moojeni_08 .A....A.....G.....GG.....T.....G.....CA... [387]
 L.muta_02 .T...A.....T..G.....A.G..C.....C.... [387]
 L.muta_03 .T...A.....T..G.....A.G..C.....C.... [387]
 L.muta_06 .T...A.....T..G.....A.G..C.....C.... [387]
 L.muta_07 .T...A.....T..G.....A.G..C.....C.... [387]
 L.muta_09 .T...A.....T..G.....A.G..C.....C.... [387]
 C.d.terrificus_A4 .T...AA.....G.....T.....G.....G.....A.C.... [387]
 C.d.terrificus_A5 .T...AA.....G.....T.....G.....G.....A.C.... [387]
 C.d.terrificus_B1 .T...AA.....G.....T.....G.....G.....A.C.... [387]
 C.d.terrificus_B4 .T...AA.....G.....T.....G.....G.....A.C.... [387]
 A.nummifer|DQ657242.1 .A....A.....G.....A.G.....T.....C.....G.....T.....C.... [387]
 A.nummifer|DQ657241.1 .A....A.....G.....A.G.....T.....C.....G.....C.... [387]
 T.flavoviridis|D87548.1 .A....A.....G.....G.....C.....G.....T.....C.... [387]
 E.quadrivirgata .T...A...T.....CT...G.....G...CT...A.....C.....T.....CCAG.....C..G.....CA... [387]

400 450 500
 G.b.siniticus CAACCGAAGAAGGCTGATGGAACC-----TGTGTGAAAGCAGATACACACGGATTCTGGCACTCTACGTCCTGTGATGACAACCTCTTAGTCGTCGTGAGTTTTATTTCATTTTATGA [507]
 B.alternatus_10 G.....T.....C...G.....C.....C..... [507]
 B.alternatus_14 G.....T.....C...G.....C.....C..... [507]
 B.alternatus_03 G.....T.....C...G.....C.....C..... [507]
 B.alternatus_08 G.....T.....C...G.....C.....C..... [507]
 B.alternatus_06 G.....T.....C...G.....C.....C..... [507]
 B.erythromelas_08 .A..T.....C.....T..C.C.....G..... [507]
 B.erythromelas_10 .A..T.....C.....T..C.C.....G..... [507]
 B.erythromelas_04 .A..T.....C.....T..C.C.....G..... [507]
 B.erythromelas_12 .T.....C.....T..C.C.....G..... [507]
 B.erythromelas_14 .T.....C.....T..C.C.....G..... [507]
 B.erythromelas_02 .T.....C...G.....C.....G..... [507]
 B.neuwiedi_06 G.....T.....C...G.....C.....A..... [507]
 B.neuwiedi_08 G.....T.....C...G.....C.....A..... [507]
 B.jararaca_02 G.....T.....C...G.....C..... [507]
 B.jararaca_10 G.....T.....C...G.....C.....TA..... [507]
 B.jararaca_07 G.....T.....C...G.....C.....A..... [507]
 B.jararaca_06 G.....T.....C...GG.....C..... [507]
 B.jararacussu_01 G.....T.....C...G.....C.....G..... [507]
 B.jararacussu_07 G.....T.....C...G.....C.....G..... [507]

B.neuwiedi_11	G.....T.....C....G.....	C.....G.....	[507]
B.jararacussu_11	G.....T.....C....G.....	C.....G.....G.....	[507]
B.neuwiedi_A1	G.....T.....C....G.....	C.....G.....	[507]
B.jararacussu_05	G.....T.....C....G.....	C.....G.....G.....	[507]
B.moojeni_03	G.....T.....C.....	T.....C.....G.....	[507]
B.moojeni_12	G.....T.....C.....	T.....C.....G.....	[507]
B.moojeni_10	G.....T.....C.....	T.....C.....G.....	[507]
B.moojeni_04	G.....T.....C.....	T.....C.....G.....G.....	[507]
B.moojeni_05	G.....T.....C.....	T.....C.....G.....	[507]
B.moojeni_08	G.....T.....C.....	T.....C.....G.....	[507]
L.muta_02TG.....C.....G.....	[507]
L.muta_03TG.....C.....G.....	[507]
L.muta_06TG.....C.....G.....	[507]
L.muta_07TG.....C.....G.....	[507]
L.muta_09TG.....C.....G.....	[507]
C.d.terrificus_A4T.....	A..A.....A.....	[507]
C.d.terrificus_A5T.....	A..A.....A.....	[507]
C.d.terrificus_B1T.....	A..A.....C.....A.....	[507]
C.d.terrificus_B4T.....	A..A.....A.....A.....	[507]
A.nummifer DQ657242.1TG.....C.....G.....	[507]
A.nummifer DQ657241.1TG.....C.....G.....	[507]
T.flavoviridis D87548.1A..TG.....C.....G.....A.....	[507]
E.quadrivirgata	G.....T..C..G..C...A.AAGTTG..C.....	G...G..GC.....G.....AG.....G..G.....A...C.....C.G.---	[507]

Figura 8. Alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos codificadores de homólogos de inibidores de fosfolipase A₂ da classe alfa a partir da seqüência codificando o peptídeo sinal. Duas seqüências de αPLIs de serpentes asáticas da subfamília Crotalinae, *Gloydus blomhofii siniticus* (AB026666) (usada como referência) e *Trimeresurus flavoviridis* (D87548.1), além de duas seqüências de uma serpente da América Central, *Atropoides nummifer* (DQ657242.1 e DQ657241.1), foram incluídas para comparação (todas as três espécies pertencem à subfamília Crotalinae). αPLI de *Elaphe quadrivirgata* (AB030247) (família Colubridae) foi usada como grupo externo na análise filogenética. A região em negrito indica o início da proteína madura (região de anelamento do iniciador P3). Resíduos iguais são mostrados com pontos e *gaps* são indicados por “-”

	113	123	133	143	153	163	
G.b.siniticus	NVLERHNKEAYLVVGN	SANFTNWAEGQPKKADGT	--CVKADTHGF	WHSTSCDDNLLV	VCFYFIL*		[169]
B.alternatus_03D.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.alternatus_06D.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.alternatus_08D.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.alternatus_10D.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.alternatus_14D.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.erythromelas_02F.....	A..N.A..--S..A.....				[169]
B.erythromelas_04F.....	A..N.A..--S..A.....				[169]
B.erythromelas_08F.....	A..N.A..--S..A.....				[169]
B.erythromelas_10F.....	A..N.A..--S..A.....				[169]
B.erythromelas_12F.....	A..N.A..--S..A.....				[169]
B.erythromelas_14F.....	A..N.A..--S..A.....				[169]
B.neuwiedi_A1G.....	A.E.N.A.A--S..A.....				[169]
B.neuwiedi_06G.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.neuwiedi_08G.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.neuwiedi_11G.....	A.E.N.A.A--S..A.....				[169]
B.jararaca_02G.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.jararaca_06G.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.jararaca_07G.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.jararaca_10G.....	A.E.N.A.A--S.....				[169]
B.jararacussu_01G.....	A.E.N.A.A--S..A.....		Y.		[169]
B.jararacussu_05G.....	A.E.N.A.A--S..A.....		M.		[169]
B.jararacussu_07G.....	A.E.N.A.A--S..A.....		M.		[169]
B.jararacussu_11G.....	A.E.N.A.A--S..A.....		M.		[169]
B.moojeni_03G.....	A.E.N.A..--S..A.....				[169]
B.moojeni_04G.....	A.E.N.A..--S..A.....		R.		[169]
B.moojeni_05G.....	A.E.N.A..--S..A.....				[169]
B.moojeni_08G.....	A.E.N.A..--S..A.....				[169]
B.moojeni_10G.....	A.E.N.A..--S..A.....				[169]
B.moojeni_12G.....	A.E.N.A..--S..A.....				[169]
L.muta_02DDP.....	A..NE.....S..A.....				[169]
L.muta_03DDP.....	A..NE.....S..A.....				[169]
L.muta_06DDP.....	A..NE.....S..A.....				[169]
L.muta_07DDP.....	A..NE.....S..A.....				[169]
L.muta_09DDP.....	A..NE.....S..A.....				[169]
C.d.terrificus_A4F.....	A..N.....KQ.....				[169]
C.d.terrificus_A5F.....	A..N.....KQ.....				[169]
C.d.terrificus_B1F.....	A..N.....KQ..C.....				[169]
C.d.terrificus_B4F.....	A..N.....KQ.....		*		[169]
A.nummifer	D.....A.....	A..NE.....S..A.....				[169]
A.nummifer	D.....A.....	V..NE.....S..A.....				[169]
T.flavoviridis	S.....A.....	A..NE.....S..A..E.....				[169]
E.quadrivirgata	S.....A.....	Q...K....	A.E.NN...NKL....	AQ.A..A..	ED.....	S..*-	[169]

Figura 9. Alinhamento múltiplo das estruturas primárias deduzidas para inibidores homólogos de fosfolipase A₂ da classe alfa, a partir da região do peptídeo sinal. Duas seqüências de α PLIs de serpentes asáticas *G. b. siniticus* (usada como referência) e *T. flavoviridis*, além de duas da serpente *A. nummifer*, da América Central, foram incluídas para comparação (todas da subfamília Crotalinae). A seqüência do α PLI de *Elaphe quadrivirgata* (família Colubridae) foi usada como grupo externo na análise filogenética. Resíduos iguais são mostrados com pontos, gaps são indicados por “-“ e o códon de terminação é marcado com “*”. O peptídeo sinal está colorido em cinza.

6.1.4. Análise das mutações nucleotídicas detectadas nos α PLIs

A seqüência do α PLI da serpente *Gloydius blomhoffii siniticus* foi utilizada como referência para o alinhamento de nucleotídeos e de aminoácidos por ser a única espécie de serpente Crotalinae em que as três classes de inibidores (alfa, beta e gama) foram seqüenciadas e depositadas em banco de dados. Foram incluídas também as espécies *Trimeresurus flavoviridis* (Crotalinae) e *Elaphe quadrivirgata* (Colubridae), serpentes de ocorrência na Ásia, além de uma espécie Crotalinae da América Central (*Atropoides nummifer*) para comparação.

A partir do alinhamento das seqüências nucleotídicas dos novos α PLIs brasileiros mostrada na Figura 8, foi possível verificar uma série de substituições de nucleotídeos em várias posições. Assim, para avaliar estas mutações, foi realizada a quantificação destas em termos de mutações sinônimas (mutações de nucleotídeos que não produzem troca de aminoácidos) e não-sinônimas (mutações de nucleotídeos que produzem troca de aminoácidos). A Tabela 3 mostra o número de mutações sinônimas versus não-sinônimas, utilizando a seqüência do α PLI de *Gloydius blomhoffii siniticus* ABO26666 (Crotalinae) como referência. Na Figura 10 é também mostrada uma representação gráfica da relação mutações sinônimas sobre mutações não-sinônimas (Dn/Ds).

Tabela 3. Nucleotídeos mutados em α PLIs

Seqüência	Nucleotídeos mutados		Total	Dn/Ds
	Não-sinônima N° (Dn)	Sinônima N° (Ds)		
A.nummifer	35	8	43	4,4
A.nummifer	34	7	41	4,9
B.alternatus03	30	19	49	1,6
B.alternatus06	30	20	50	1,5
B.alternatus08	30	19	49	1,6
B.alternatus10	30	19	49	1,6
B.alternatus14	30	19	49	1,6
B.erythromelas02	29	20	49	1,5
B.erythromelas04	30	21	51	1,4
B.erythromelas08	29	21	50	1,4
B.erythromelas10	29	21	50	1,4
B.erythromelas12	29	20	49	1,5
B.erythromelas14	29	20	49	1,5
B.jararaca02	29	20	49	1,5
B.jararaca06	29	21	50	1,4
B.jararaca07	29	22	51	1,3
B.jararaca10	30	21	51	1,4
B.jararacussu01	34	25	59	1,4
B.jararacussu05	32	22	54	1,5
B.jararacussu07	34	25	59	1,4
B.jararacussu11	35	24	59	1,5
B.moojeni03	32	22	54	1,5
B.moojeni04	28	18	46	1,6
B.moojeni05	28	20	48	1,4
B.moojeni08	28	21	49	1,3
B.moojeni10	31	22	53	1,4
B.moojeni12	32	22	54	1,5
B.neuwiedi06	32	20	52	1,6
B.neuwiedi08	32	20	52	1,6
B.neuwiedi11	33	25	58	1,3
B.neuwiediA1	35	24	59	1,5
C.d.terrificusA4	30	16	46	1,9
C.d.terrificusA5	30	16	46	1,9
C.d.terrificusB1	31	16	47	1,9
C.d.terrificusB4	31	16	47	1,9
E.quadrivirgata	48	49	97	1,0
L.muta02	29	11	40	2,6
L.muta03	29	11	40	2,6
L.muta06	29	11	40	2,6
L.muta07	29	11	40	2,6
L.muta09	30	11	41	2,7
T.flavoviridis	37	18	55	2,1

A seqüência do α PLI de *Gloydus blomhoffii siniticus* (AB026666) foi usada como referência. Apenas mutações que ocorreram em pelo menos 8 seqüências foram consideradas.

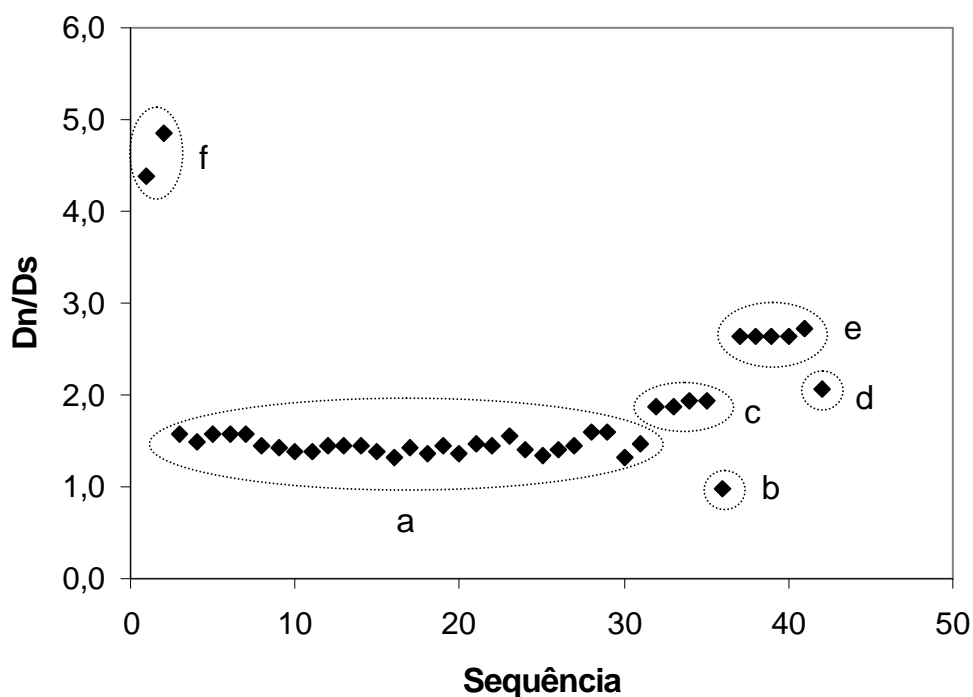


Figura 10. Representação gráfica da relação mutações não sinônimas sobre mutações sinônimas (Dn/Ds) nas seqüências de α PLIs. Na abscissa estão representadas as seqüências conforme a ordem de numeração da Tabela 4. Os agrupamentos de pontos referem-se a: a- serpentes do gênero *Bothrops*; b- *E. quadrivirgata*; c- *C. d. terrificus*; d- *T. flavoviridis*; e- *L. mta* e f- *A. nummifer*.

6.1.5. Análise filogenética para α PLIs

A Figura 9 mostra o cladograma para α PLIs gerado pelo método de Neighbour-joining a partir do alinhamento múltiplo realizado com as seqüências nucleotídicas. O programa utilizado foi o MEGA v.4.0 com o código genético padrão. As seqüências de α PLIs das serpentes asiáticas *Gloydius blomhoffii siniticus* e *Trimeresurus flavoviridis* foram incluídas na análise, assim como a espécie *Atropoides nummifer*, da Costa Rica. Todas são da família Viperidae, subfamília Crotalinae. Verificamos que as seqüências de cada espécie brasileira formam agrupamentos principais, exceto as de *B. neuwiedi* que se misturam, ora com as de *B. jararacussu*, ora entre *B. jararaca* e *B. alternatus/B. erythromelas*.

6.1.6. Análises de modificações pós-traducionais

As massas moleculares e os pontos isoelétricos das proteínas deduzidas para α PLIs das serpentes brasileiras foram calculadas com o programa Vector NTI Suite 10.1 (Invitrogen, EUA). Eles apresentaram massas moleculares médias de 18.514,83 Da. Os pontos isoelétricos calculados variaram entre 5,26 e 6,65.

Sítios potenciais de N-glicosilação foram pesquisados *in silico* para as proteínas deduzidas de todas as seqüências de α PLIs estudados. A predição de sítios de N-glicosilação resultou negativa para a maioria das seqüências. Apenas as seqüências de *B. alternatus*, *B. erythromelas* e algumas *B. newwiedi* apresentaram sítios potenciais nos resíduos de número 61 (seqüência NGSE), incluindo-se o peptídeo sinal.

Pesquisa de sítios potenciais de fosforilação para serina, tirosina e treonina foram realizadas para cada seqüência dos novos homólogos de PLIs. Para inibidores da classe alfa foram encontrados potenciais sítios para serina e/ou tirosina-quinase, além de sítios de treonina-quinase nas seqüências de pelo menos um clone de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. newwiedi* e *C. d. terrificus* (Tabela 4).

Tabela 4. Sítios de fosforilação preditos para α PLIs de serpentes Crotalinae brasileiras

Seqüência	Resíduo alvo	Seqüência consenso	Score
B.alternatus:03/06/08/10/14	S12	KLLNSLIDA	0.968
	S39	YKARSFGNG	0.910
	S132	WHSTSCDDN	0.968
	T131	SWHSTSCDD	0.954
	Y48	SERLYVTNK	0.981
	Y95	NKEAYLVVG	0.970
B.erythromelas:02/04/08/10/12/14	S12	KVLNSLIDA	0.981
	S39	YKARSFGNG	0.910
	S132	WHSASCDDN	0.936
	Y48	SERLYVTNK	0.981
B.jararaca: 02/06/07/10	S12	KVLNSLIDA	0.981
	S132	WHSTSCDDN	0.968
	T131	SWHSTSCDD	0.954
	Y48	SERLYVTNK	0.981
	Y95	GKEAYLVVG	0.936
B.jararacussu:01/07/11	S12	KLLNSLIDA	0.988
B.jararacussu:05	S12	KVLNSLIDA	0.981
B.jararacussu:01/07/11	S132	WHSASCDDN	0.936
	Y48	SERMYVTNK	0.970
	Y95	GKEAYLVVG	0.936
B.moojeni:03/10/12	S12	KVLNSLIDT	0.990
B.moojeni:03/04/05/08/10/12	S39	HRARSFGSG	0.974
	S132	WHSASCDDN	0.936
	Y48	SERMYVTNK	0.970
	Y95	GKEAYLVVG	0.936
	S12	KVLNSLIDS	0.985
B.neuwiedi:A1	S12	KVVNSLIDA	0.987
B.neuwiedi:A1/11	S132	WHSASCDDN	0.936
B.neuwiedi:A1/06/08/11	Y48	SERMYVTNK	0.970
	Y95	GKEAYLVVG	0.936
B.neuwiedi:06/08/11	S12	KVLNSLIDA	0.981
B.neuwiedi:06/08	S39	YKARSFGNG	0.910
	S132	WHSTSCDDN	0.968
	T131	SWHSTSCDD	0.954
C.d.terrificus:A4/A5/B1/B4	S50	RLYVSNKEI	0.993
	S132	WHSTSCDDN	0.931
C.d.terrificus:A4/B1/B4	T131	FWHSTSCDD	0.930
C.d.terrificus:A4/A5/B1/B4	Y48	SERLYVSNK	0.987
L.muta:02/03/06/07/09	S12	QMLNSVIES	0.958
	S50	RLYVSNKEI	0.981
	S132	WHSASCDDN	0.936
	Y48	SERLYVSNK	0.987
	Y95	NKEAYLVVD	0.951

6.1.7. Pesquisa de domínios conservados para α PLIs

A pesquisa por domínios conservados nas seqüências dos PLIs foi realizada através do BLASTp no Genbank e no InterProScan, conforme descrito na metodologia. Os resultados obtidos indicam uma significativa similaridade dos α PLIs seqüenciados neste trabalho, com a proteína surfactante pulmonar SP-A (identificação no banco de dados do PDB: 1r13). A Figura 12 é mostrada para exemplificar os dados de saída do BLASTp no Genbank e no InterPro, quando a seqüência Lmuta03 foi usada na pesquisa.

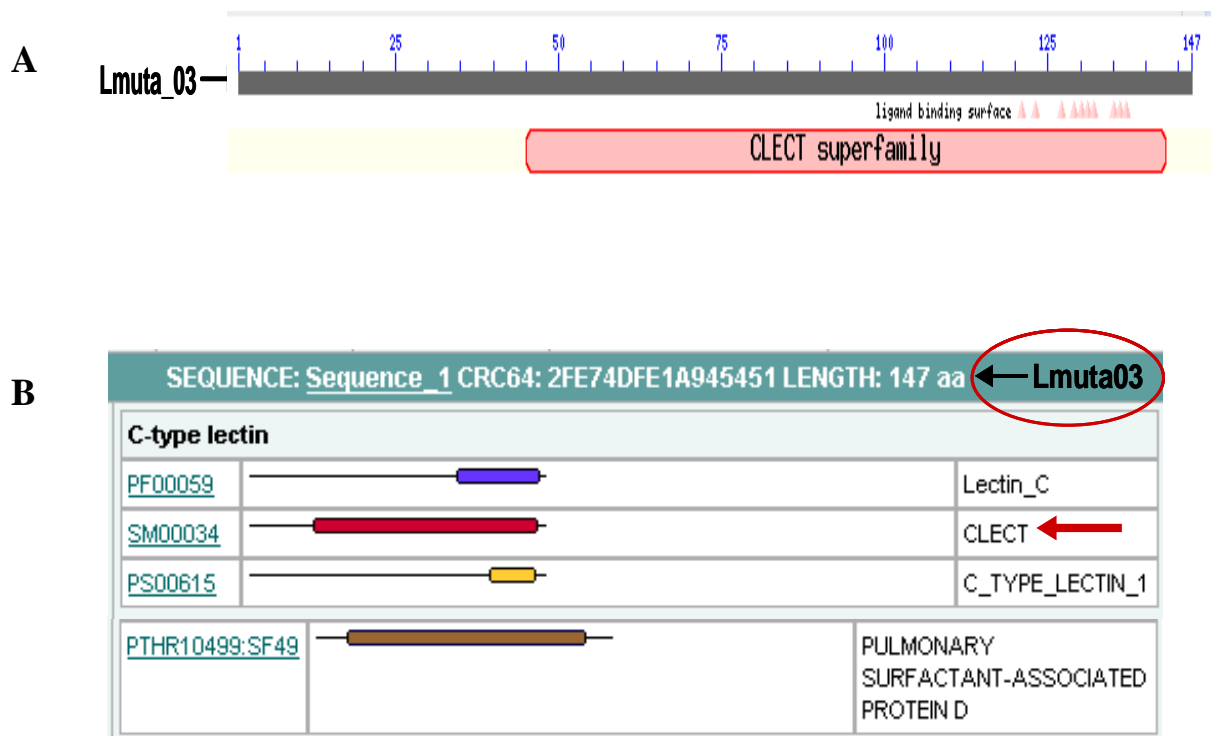


Figura 12. Domínios conservados na estrutura de um α PLI. A seqüência Lmuta_03 foi usada como entrada (*query*). (A) Resultado da pesquisa de domínios no Genbank. A região identificada como superfamília CLECT se refere ao segmento da proteína Lmuta_03 que apresenta um domínio conservado similar ao da superfamília de lectinas tipo-C ligantes de manose; (B) Resultado da pesquisa no banco de dados InterPro. A seta em vermelho indica a região do domínio da superfamília; em roxo, o domínio de lectina-C; em amarelo, o domínio tipo lectina-C e em marrom, é mostrada a região com similaridade ao domínio denominado “proteína D associada a surfactante pulmonar”. Notar que estes quatro domínios se sobrepõem na seqüência de Lmuta_03.

6.1.8. Análise de estruturas secundárias

Na Figura 13 é mostrado o resultado de predição das estruturas secundárias obtida para os inibidores da classe alfa sem a região do peptídeo sinal. Estes inibidores apresentaram 3 regiões de α -hélice todas com consenso entre os três programas de predição: a primeira região é próxima ao amino-terminal abrangendo os resíduos 08 até o 35; em seguida aparece outra região de α -hélice entre os resíduos 57 a 66 e, finalmente, a última entre os resíduos 77 a 89, aproximadamente. A segunda região chama a atenção por ser predita de forma absoluta entre os três programas. Folhas- β são vistas em 4 principais regiões, sendo que cada uma abrange poucos resíduos: 1^a, 46 a 50; 2^a, 93 a 97; 3^a, 119 a 123 e 4^a, 141 a 148.

	140	150
A.nummifer1	ccNcccE	EEEEEEENC
A.nummifer2	ccNcccc	EEEEEEENC
B.alternatus1	ccNcccE	EEEEEEENC
B.alternatus2	ccNcccE	EEEEEEENC
B.alternatus3	ccNcccE	EEEEEEENC
B.alternatus4	ccNcccE	EEEEEEENC
B.alternatus5	ccNcccE	EEEEEEENC
B.erythromelas1	ccNcccc	EEEEEEENC
B.erythromelas2	ccNcccc	EEEEEEENC
B.erythromelas3	ccNcccc	EEEEEEENC
B.erythromelas4	ccNcccc	EEEEEEENC
B.erythromelas5	ccNcccc	EEEEEEENC
B.erythromelas6	ccNcccc	EEEEEEENC
B.jararaca1	ccNcccE	EEEEEEENC
B.jararaca2	ccNcccE	EEEEEEENC
B.jararaca3	ccNcccE	EEEEEEENC
B.jararaca4	ccNcccE	EEEEEEENC
B.jararacussu1	ccNcccE	EEEEEEENC
B.jararacussu2	ccNcccE	EEEEEEENC
B.jararacussu3	ccNcccE	EEEEEEENC
B.jararacussu4	ccNcccE	EEEEEEENC
B.moojeni1	ccNcccE	EEEEEEENC
B.moojeni2	ccNcccE	EEEEEEENC
B.moojeni3	NcNcccE	EEEEEEENC
B.moojeni4	NcNcccE	EEEEEEENC
B.moojeni5	NcNcccE	EEEEEEENC
B.moojeni6	ccNcccE	EEEEEEENC
B.neuwiedi1	ccNcccE	EEEEEEENC
B.neuwiedi2	ccNcccE	EEEEEEENC
B.neuwiedi3	ccNcccE	EEEEEEENC
B.neuwiedi4	ccNcccE	EEEEEEENC
C.d.terrificus1	ccNcccc	EEEEEEENC
C.d.terrificus2	ccNcccc	EEEEEEENC
C.d.terrificus3	ccNcccc	EEEEEEENC
C.d.terrificus4	ccNcccc	EEEEEEENC-
L.muta1	NcNcccc	EEEEEEENC
L.muta2	NcNcccc	EEEEEEENC
L.muta3	NcNcccc	EEEEEEENC
L.muta4	NcNcccc	EEEEEEENC
L.muta5	NcNcccc	EEEEEEENC
G.b.siniticus	ccNcccE	EEEEEEENC
T.flavoviridis	ccNcccc	EEEEEEENC
E.quadrivirgata	ccNcccc	EEEEEEec-

Figura 13. Predição de estrutura secundária para α PLIs usando 3 diferentes algoritmos.

O alinhamento foi realizado com o resultado consenso para os 3 algoritmos em cada proteína. Símbolos: C- random coil (colorida em verde); E- folha β (azul); H- α -hélice (vermelho); N- região sem consenso; "-" - gap. Consenso para 3 diferentes algoritmos são indicados com letras maiúsculas (C, E, H) e consenso para 2 diferentes algoritmos são indicados com letras minúsculas (c, e, h).

6.1.9. Um modelo 3D para os inibidores α PLI

A suposta estrutura tridimensional da sequência da proteína Lm3 α PLI (α PLI da serpente *L. muta*) inteira, mas sem o peptídeo sinal, foi produzida através de modelagem por homologia (Figura 14A), baseado na sequência da proteína surfactante pulmonar SP-A (PDB: 1r13). Um modelo em que a α -hélice amino-terminal (que seria o segmento transmembrana do modelo SP-A) foi parcialmente retirada, é mostrado na Figura 14B.

As restrições de impedimento estereo-químico dos aminoácidos foi avaliada pelo Modeller9v3 e também pelo programa PROCHECK. O gráfico de Ramachandran gerado pelo PROCHECK mostra que o nosso modelo possui mais de 90% de resíduos em regiões mais favoráveis nenhum deles em regiões não permitidas, caracterizando o nosso modelo como um bom modelo (Figura 15).

O modelo da proteína Lm3 α PLI obtido foi comparado ao PLI alfa proposto por Okumura e cols. (2005), como mostrado na Figura 16 (A a C), onde o modo de interação entre as subunidades é sugerido, uma vez que todas as α PLIs já reportadas são proteínas que se complexam com as PLA₂ através de um trímero. Está também esquematizado na Figura 16 (B e C) uma sugestão da maneira com a qual o homotrímero iria interagir entre si e com as moléculas de sPLA₂ para a formação do complexo α PLI- sPLA₂.

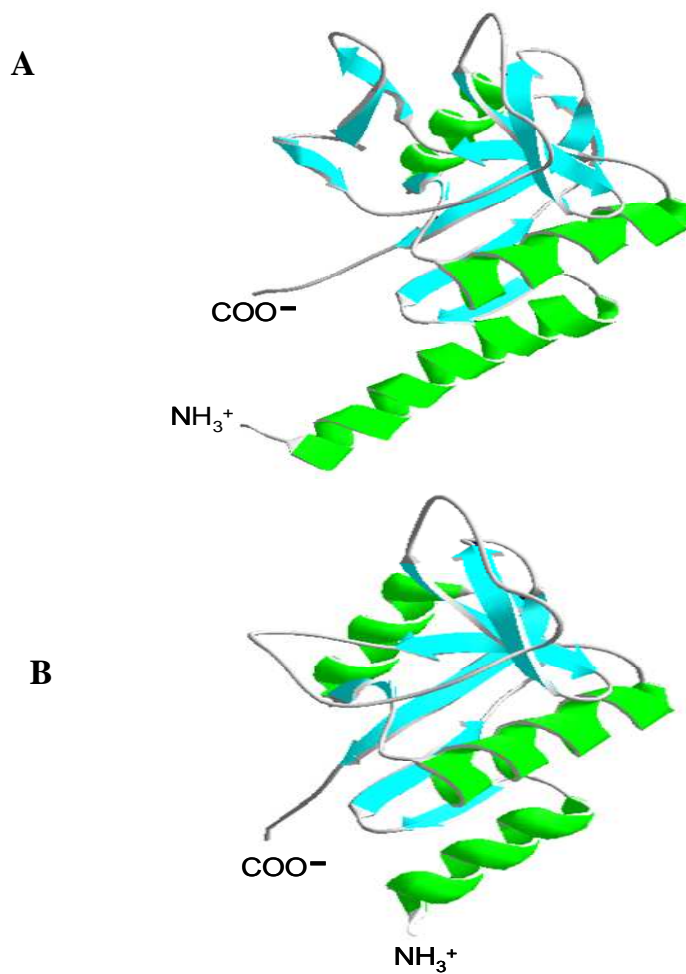


Figura 14. (A)- Estrutura 3D sugerida para a proteína Lm03- α PLI (α PLI de *L. muta*) gerada por homologia à proteína SP-A, utilizando o programa Modeller9v3. (B)- Sugestão da estrutura 3D para a proteína Lm03- α PLI quando se retira parte do segmento correspondente à hélice amino-terminal da SP-A. As cores mostram as estruturas secundárias α -hélice (verde) e folhas-beta (azul).

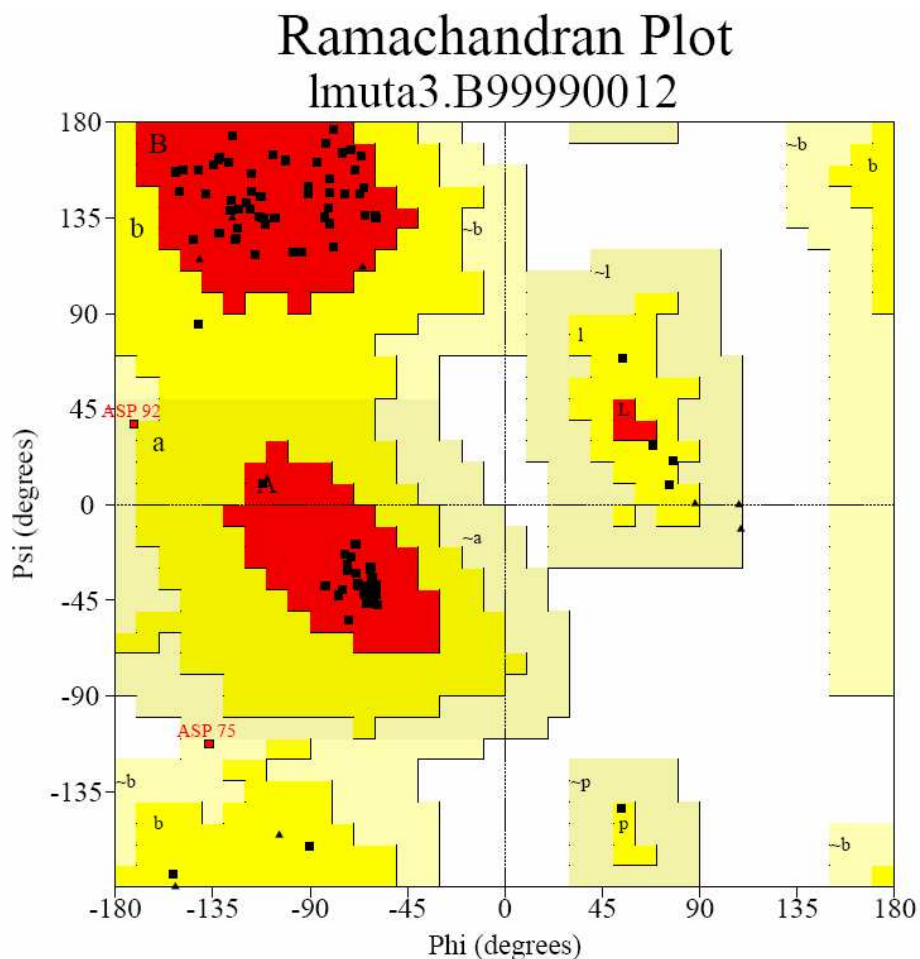


Figura 15. Plot de Ramachandran gerado pelo PROCHECK durante avaliação da qualidade do modelo 3D produzido para o α PLI. Resíduos em regiões mais favoráveis [A,B,L]: 99 (90.8%); Resíduos em regiões permitidas adicionais [a,b,l,p]: 8 (7.3%); Resíduos em regiões fracamente permitidas [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p]: 2 (1.8%); Resíduos em regiões não permitidas: 0 (0.0%).

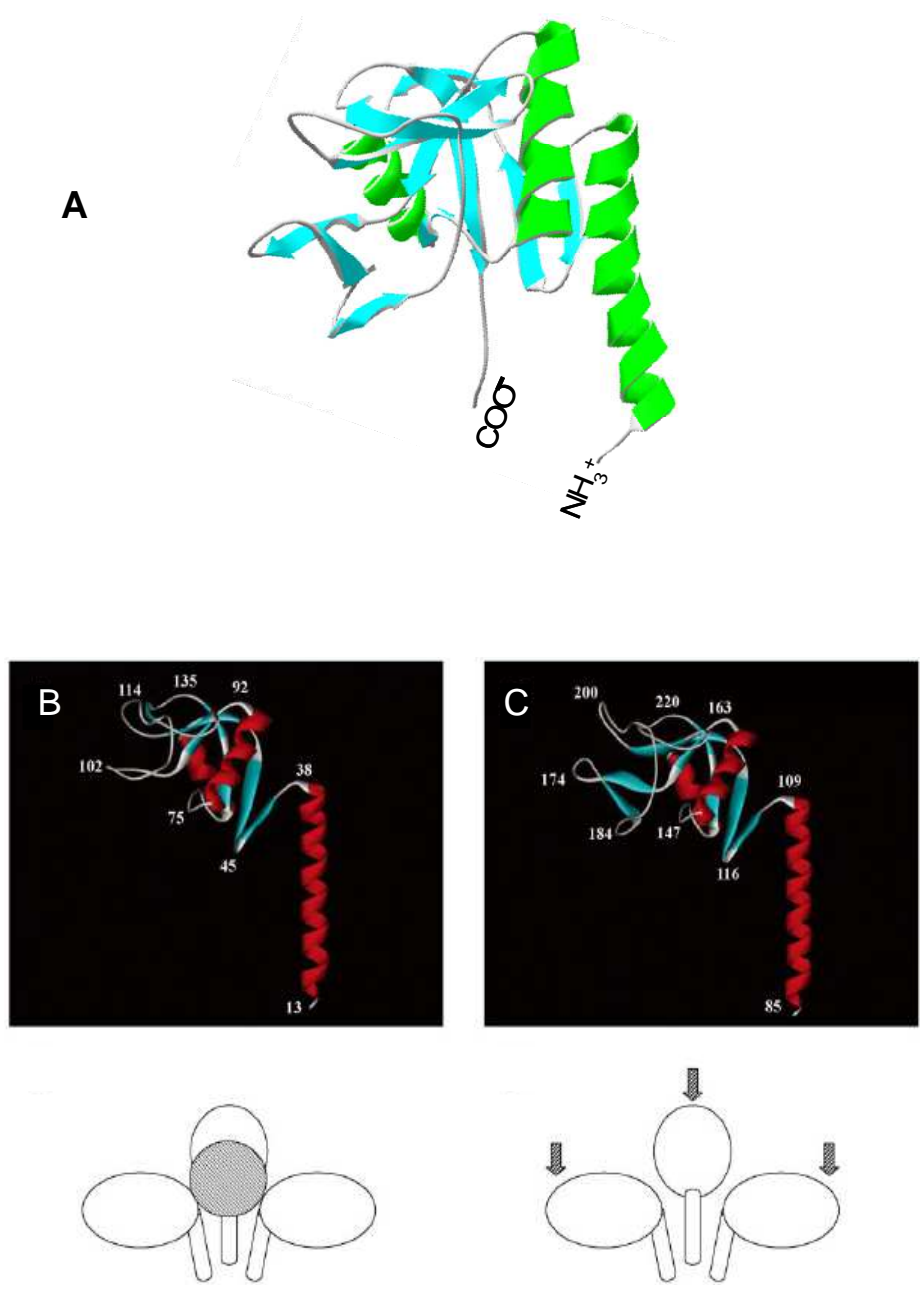


Figura 16. (A). Comparação da estrutura 3D da Lmuta03- α PLI (A) com as estruturas de α PLIs proposta por Okumura e cols. (2005) (B) e SP-A (C). Abaixo de cada quadro de estruturas estão representados os complexos α PLI-sPLA₂ e o provável modo de interação entre as subunidades dos α PLIs, respectivamente. As α -hélices estão em vermelho e as folhas- β em amarelo.

6.1.10. Clonagem e expressão de CdtA4- α PLI recombinante em vetor pET-32(c+)

A) Preparação do DNA do inserto para clonagem do cDNA de inibidor alfa

O fragmento de DNA codificador para CdtA4- α PLI foi usado como inserto para a clonagem no vetor de expressão pET-32(c+). Primeiramente o DNA foi amplificado por PCR e apresentou, na eletroforese em gel de agarose a 1%, uma banda única com cerca de 500 pb (Figura 13). Esse tamanho corresponde ao esperado da sequência de CdtA4- α PLI, sem peptídeo sinal, acrescida dos sítios de restrição para *KpnI* e *HindIII*, introduzidos na etapa de amplificação.

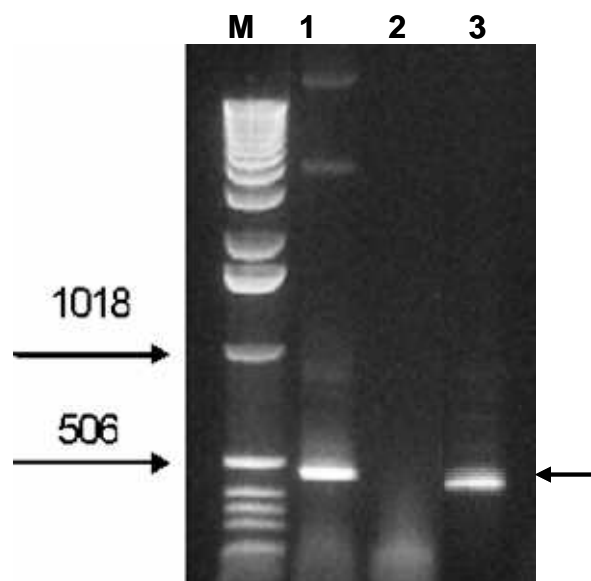


Figura 17. Eletroforese em gel de agarose a 1% para a verificação da amplificação do DNA a ser usado como inserto. P- Padrão de peso molecular 1 Kb; 1- DNA do inserto com primers MI001/CON67; 2- Controle negativo (sem DNA); 3- Controle positivo. A seta à direita indica a banda do amplicon de interesse.

B) Seleção de clones prováveis recombinantes

Após a digestão do produto da PCR e do plasmídeo com as enzimas apropriadas, estes foram ligados e o produto da ligação usado para transformar bactérias *E. coli* BL21(DE3)pLysS. Colônias prováveis recombinantes foram selecionadas e submetidas à PCR. Todas as 32 colônias obtidas foram testadas. Destas, 8 apresentaram o inserto do tamanho esperado após PCR.

C) Indução de expressão da proteína recombinante em maior escala

Um clone, dentre aqueles confirmados positivos, foi selecionado aleatoriamente para experimentos de expressão gênica em *E. coli*. Análise da expressão gênica induzida pela adição de IPTG (como descrito em metodologia) foi acompanhada por SDS-PAGE (Figura 16). O nível de expressão gênica com a síntese de uma proteína foi verificada após 1 hora do início da indução. Esta proteína induzida, de massa molecular estimada em cerca de 30 kDa, é condizente com o tamanho esperado para o inibidor alfa recombinante. A partir deste resultado, o tempo de 4 horas após a indução foi tomado como tempo padrão para os experimentos seguintes. Resultado idêntico foi obtido com outros clones testados.

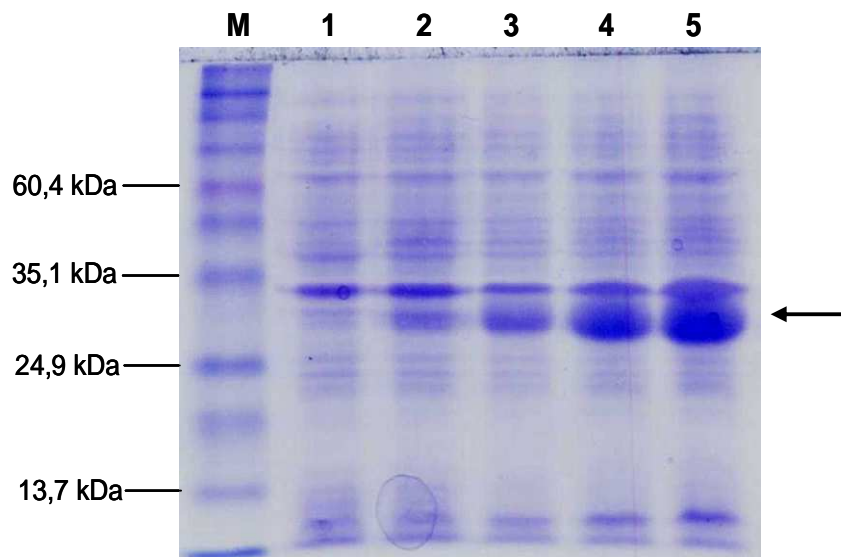


Figura 18. Expressão da proteína Cdt- α PLI recombinante em *E. coli* BL21(DE3)pLysS avaliada em SDS-PAGE 12% corado pelo azul de Coomassie. M- marcador de massa molecular; 1 – controle sem indução; 2 -1h após indução com IPTG; 3 - 2 h após indução; 4 - 3 h após indução; 5 - 4 h após indução. A seta à direita indica a banda correspondente à proteína de interesse.

D) Determinação da solubilidade da proteína recombinante induzida.

Experimento de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS foi realizado para verificar se a proteína recombinante induzida estava sendo expressa no sobrenadante ou no *pellet* da cultura bacteriana. Na Figura 19 podemos verificar que a proteína recombinante induzida estava presente tanto no sobrenadante quanto no *pellet* da cultura bacteriana.

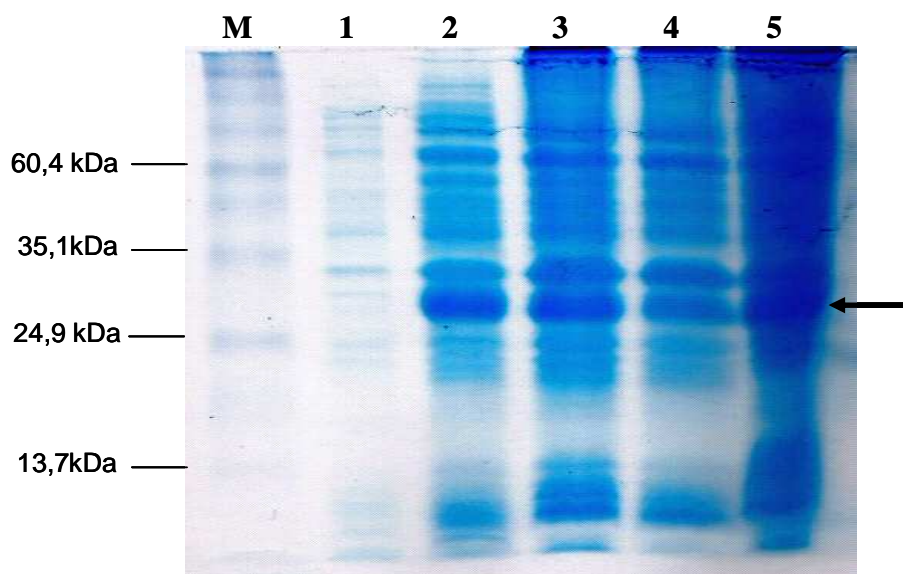


Figura 19. Determinação da solubilidade da proteína Cdt α PLIr recombinante. Para verificar se a proteína recombinante estava expressa de forma solúvel no sobrenadante ou precipitado da cultura bacteriana foram analisados em SDS-PAGE 12,5% corado por azul de coomassie. M- marcador de massa molecular, 1- cultura antes da indução por IPTG; 2- cultura após a indução por IPTG por 4 h; 3- extrato celular em tampão de lise após sonicação; 4- sobrenadante do extrato celular em tampão de lise após sonicação; 5- *pellet* do extrato celular em tampão de lise após sonicação. A seta à direita indica a banda da correspondente à proteína de interesse.

6.1.11. Purificação da proteína recombinante expressa

A proteína recombinante induzida, expressa no sobrenadante e no *pellet* do lisado bacteriano foi purificada por meio de dois métodos baseados em afinidade:

A) Cromatografia de afinidade por quelação de metal (níquel) em sistema HPLC.

A Figura 20 apresenta os perfis cromatográficos de purificação da proteína recombinante induzida através da coluna de quelação de metal (NiSO₄) HiTrap Chelating (GE Helthcare, EUA) em sistema HPLC. São mostrados o perfil da proteína purificada a partir do sobrenadante e do *pellet* do lisado bacteriano. O rendimento da proteína recombinante obtida do sobrenadante é aproximadamente o dobro daquele obtido a partir do *pellet* solubilizado em tampão inicial.

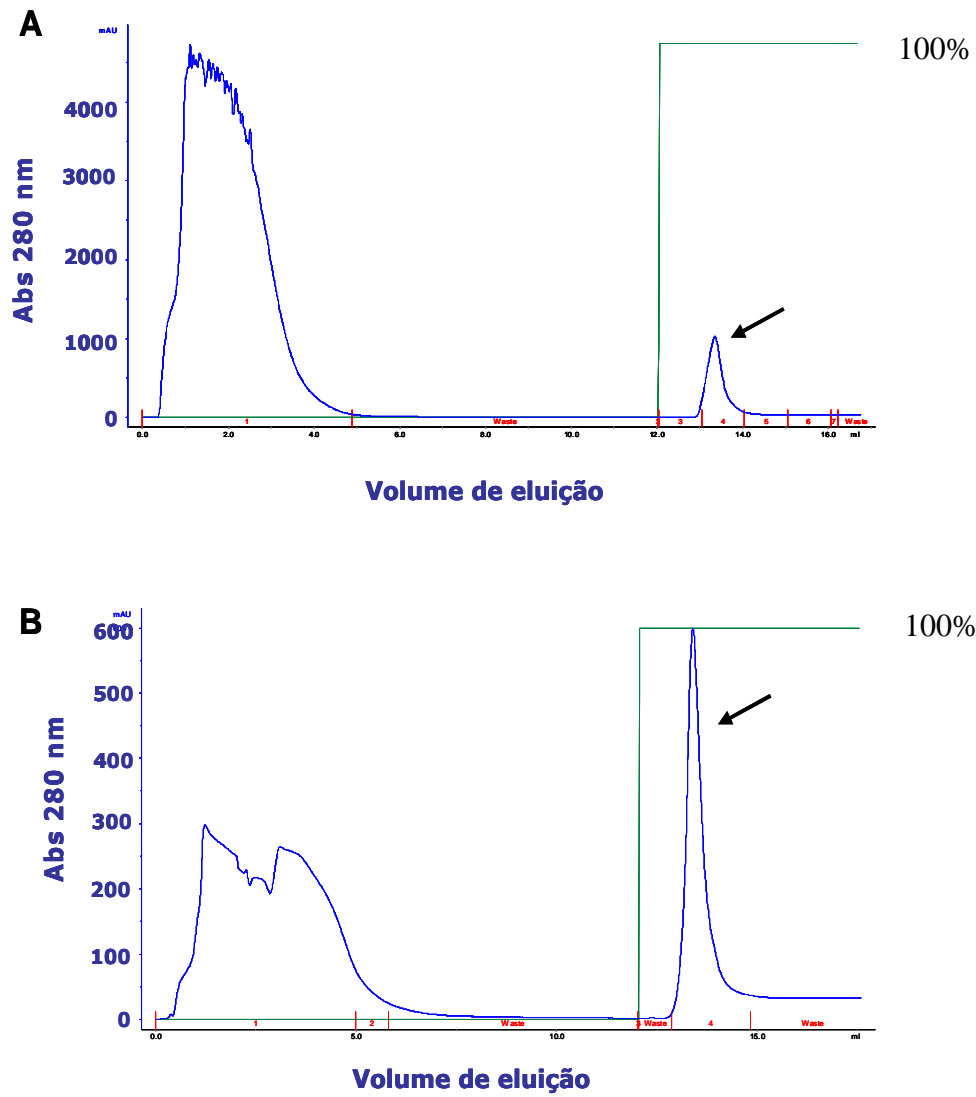


Figura 20. Perfil cromatográfico (HPLC) de purificação da proteína Cdt α PLI recombinante a partir do sobrenadante (A) e do *pellet* (B). As setas indicam os picos referentes à eluição da proteína recombinante. Em verde está representado o gradiente de concentração de imidazol utilizado.

B) Cromatografia de afinidade em coluna sepharose-Bothropstoxina-I

Além da purificação da proteína recombinante expressa por meio de quelação em níquel, foi feita uma tentativa de se capturar esta proteína sob forma funcional em coluna de afinidade com uma miotoxina. Para isto, a Bothropstoxina-I (Bhtx1) foi purificada a partir do veneno total de *B. jararacussu* e foi preparada a coluna sepharose-BhtxI. Na Figura 21 são mostradas as etapas cromatográficas para purificação de Bothropstoxina-I e análise do material purificado. O perfil obtido na cromatografia analítica indica que o material está homogêneo o suficiente para ser utilizado como ligante em coluna de afinidade.

Após a proteína ter sido acoplada à resina (sepharose-BhtxI), foram realizados experimentos de purificação de Cdt- α PLI recombinante a partir do sobrenadante de cultura bacteriana. A purificação foi avaliada em SDS-PAGE corado por azul de Coomassie (Figura 22). Foi verificada a retenção, por afinidade, de uma banda de cerca de 35 kDa, que é o tamanho esperado para a proteína CdtA4- α PLI recombinante.

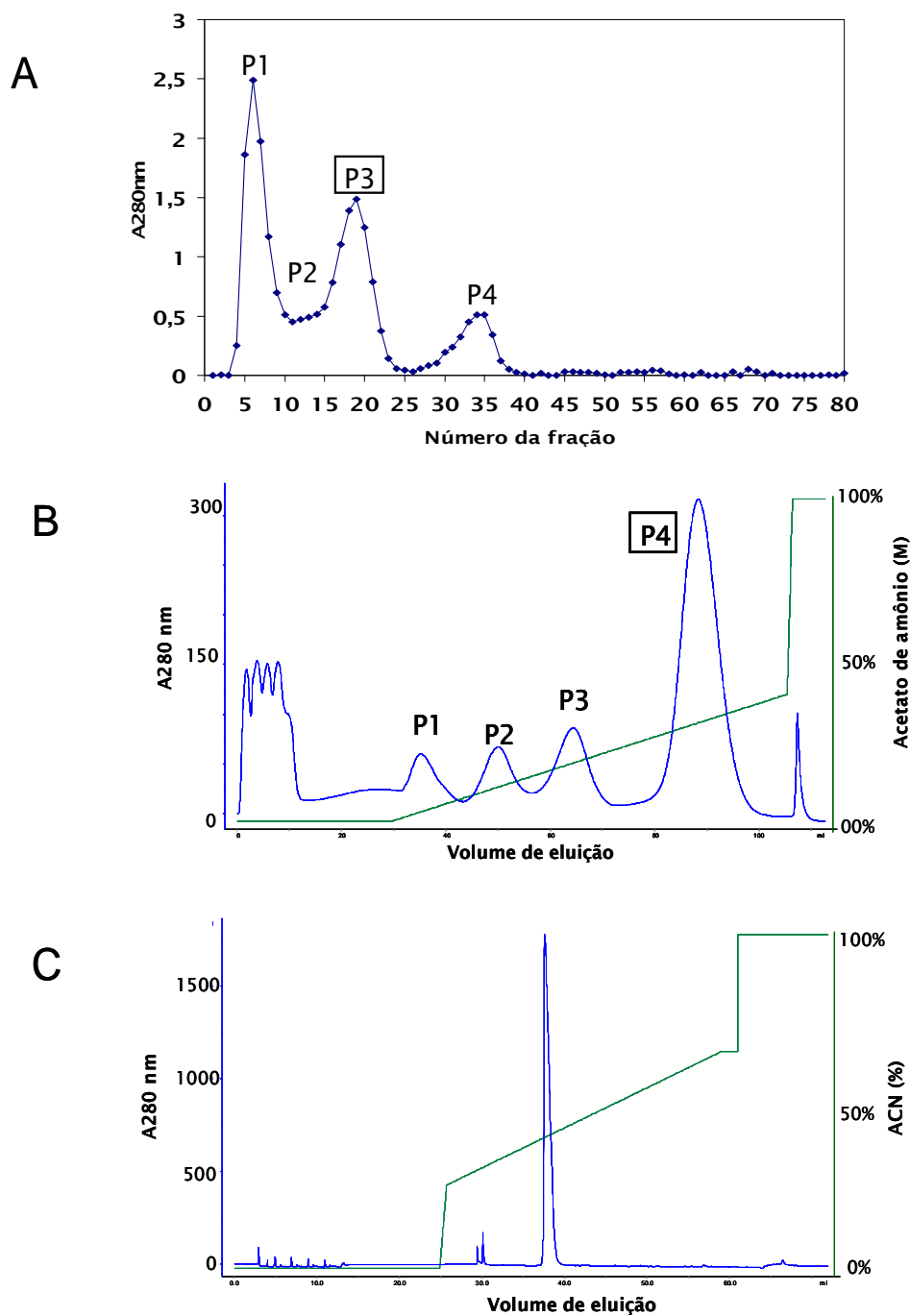


Figura 21. Etapas cromatográficas para purificação (A e B) e análise (C) de Bothropstoxina-I a partir do veneno bruto de *B. jararacussu*. A- filtração molecular. O pico P3 foi submetido à coluna de troca iônica (B), sendo que o material de interesse (pico P4) eluiu com 40% do gradiente de acetato de amônio 1,8 M, pH 5,0; C- fase reversa analítica para avaliação da homogeneidade da preparação final. Bothropstoxina I foi eluída com 40% do gradiente de ACN.

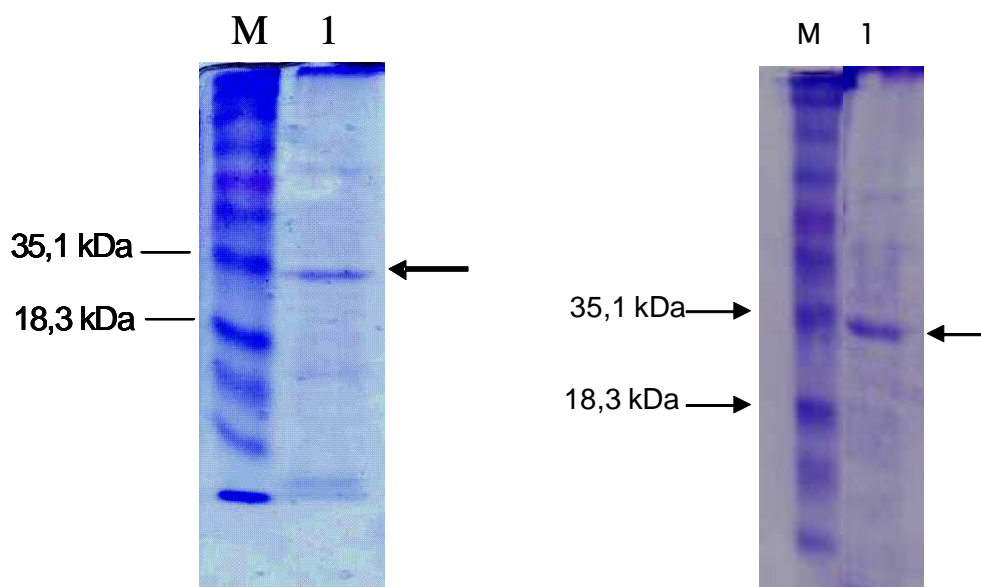


Figura 22. SDS-PAGE da proteína Cdt α PLI recombinante purificada por afinidade em (A) coluna de sepharose-Bhtx I e (B) coluna de quelação de metal (NiSO₄). O gel foi corado com azul de Coomassie. M- padrão massa molecular; 1- alfa-PLI recombinante. A seta à direita indica a banda da proteína de interesse.

6.2. PROSPECÇÃO DE INIBIDORES DA CLASSE GAMA

6.2.1. RT-PCR de amostras de tecido hepático de serpentes

Os RNAs utilizados nos estudos dos inibidores da classe gama foram preparados e analisados da mesma forma descrita para a classe alfa (Figura 6).

6.2.2. Detecção de cDNA codificador de γ PLIs

Da mesma que para a classe alfa, os cDNAs codificadores da classe gama eram amplificados com iniciadores específicos, após a síntese da primeira fita: P1/P2 (5'UTR/segmento carboxi-terminal) ou P4/P2 (proteína madura/segmento carboxi-terminal), excet para o cDNA de *B. alternatus*, o qual não foi amplificado pelo par de iniciadores P1/P2. Neste caso foi utilizado o par P3 (segmento do peptídeo sinal)/P2.

Foram encontrados produtos de amplificação dos tamanhos 860 pb e 545 pb para o homólogo do inibidor gama (Figura 23) correspondendo aos tamanhos compatíveis com os segmentos 5'UTR/carboxi-terminal (860 pb) e amino-terminal/carboxi-terminal (545), respectivamente.

Estes resultados confirmam a presença γ PLIs nas espécies *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. As seqüências de *C. d. terrificus* (acessos [U08289](#)) e *L. muta* já haviam sido reportadas anteriormente ([AY425347](#) e [AY425346](#)).

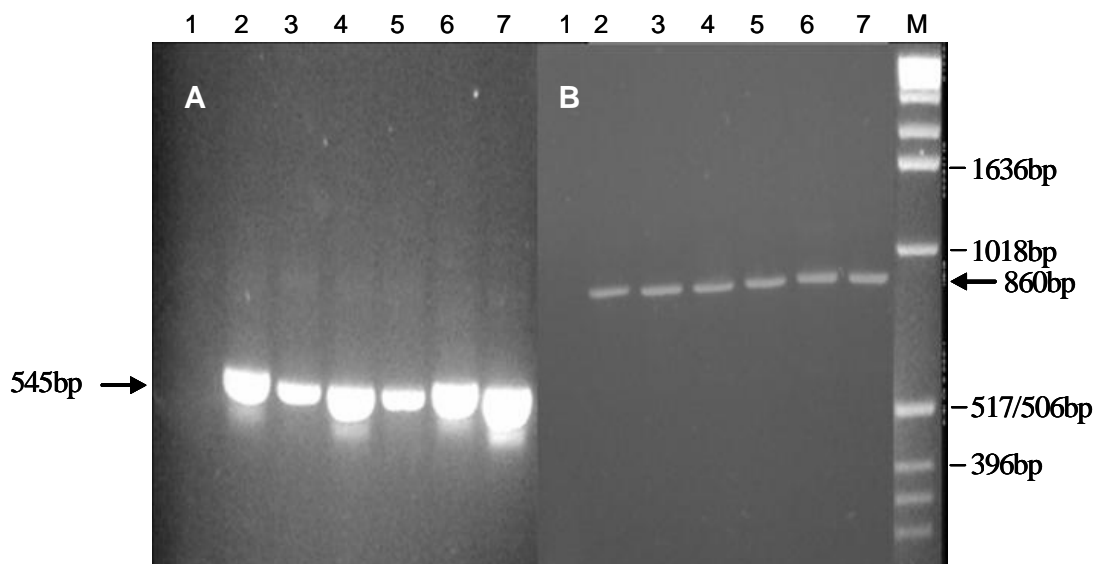


Figura 23. Gel agarose a 1% para confirmar a presença do gene codificador do inibidor gama de PLA₂. Em “A” foram usados iniciadores externos à sequência codificadora; em “B”, foram usados iniciadores para a sequência madura contendo peptídeo sinal. 1. CN; 2. *B. alternatus*; 3. *B. erythromelas*; 4. *B. jararaca*; 5. *B. jararacussu*; 6. *B. moojeni*; 7. *B. neuwiedi*; M. Padrão de massa molecular 1kb. Foram utilizados 0,5 µg de cDNA.

6.2.3. Clonagem e seqüenciamento dos cDNAs codificadores de γ PLIs

Os produtos recentes das PCRs com iniciadores específicos, foram utilizados para a ligação com vetores plasmidiais do tipo TA. Em seguida, o DNA plasmidial foi purificado foram submetido ao seqüenciamento, de forma idêntica ao procedimento feito para inibidores alfa. As seqüências obtidas foram editadas manualmente e, em seguida, foram submetidas ao BLASTn (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), para busca de similaridade. As seqüências foram alinhadas entre si e com as seqüências obtidas em bancos de dados públicos para construção de árvores filogenéticas. Os alinhamentos das seqüências de nucleotídeos e de aminoácidos são mostrados nas Figuras 24 e 25, respectivamente.

As estruturas primárias deduzidas para os γ PLIs das serpentes do gênero *Bothrops* são mostradas na Figura 25. O segmento do peptídeo sinal, com 19 resíduos de aminoácidos, apresentou uma alta taxa de conservação. As proteínas maduras apresentaram 181 resíduos, exceto para *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*, que apresentaram uma inserção idêntica de 4 resíduos a partir da posição 153 (F¹⁵⁴S¹⁵⁵A¹⁵⁶V¹⁵⁷). O alinhamento possibilitou verificar uma alta similaridade com inibidores gama de serpentes não brasileiras (Figura 25). As substituições de aminoácidos, quando ocorrem, são quase sempre conservativas. Por exemplo, na posição 100, todas as seqüências apresentaram o aminoácido prolina, exceto *C. d. terrificus* e as serpentes não brasileiras. Além disso, podemos verificar uma homogeneidade entre os aminoácidos das serpentes brasileiras do gênero *Bothrops*. Já o gênero *Lachesis* que apresenta um grande número de substituições entre as duas seqüências, resultando em 16 aminoácidos diferentes.

	50	100	
C.d.terrificus(CNF) U08289	ATGAAATATCTACACACCATCTGCCTTCTTTTCATTTTCGTAGCCAGAGGAAACTCTCGCTCATGTGACTTTTGTGACAAACATAGGAAAAGATTGCG--	ATGGTTACGAAGAG	[114]
B.alternatus_A2 EU155166C.....G.....	[114]
B.alternatus_B2 EU155167C.....G.....	[114]
B.erythromelas_A2 EU155168C.....C.....G.....	[114]
B.erythromelas_G1 EU155169C.....T.....C.....	[114]
B.jararaca_A4 EU155170C.....C.....	[114]
B.jararaca_B1 EU155171C.....A.....T.....	[114]
B.jararacussu_A11 EU155172C.....C.....	[114]
B.jararacussu_B11 EU155173C.....C.....	[114]
B.moojeni_A4 EU155174C.....C.....	[114]
B.moojeni_C1 EU155175C.....C.....	[114]
B.neuwiedi_D1 EU155176C.....T.....C.....	[114]
B.neuwiedi_E1 EU155177C.....T.....G.....	[114]
Lmm1 AY425347C.....G.....	[114]
Lmm2 AY425346C.....C.....	[114]
G.b.siniticus AB018372C.....A.....A.....	[114]
E.quadrivirgata AB021425C.....G.T.....T.....T.....G.GC.....AA.....G.G.....T.....T.GCT...A.....T...A		[114]
P.reticulatus AF232771CC.....G.....T.....T.....TA.....T.....C.....GA.AA.....AA.....TGG.T.T.....G.T..C..T.---TC.G...	[114]

	150	200	
C.d.terrificus(CNF)	GAATGTTCTCTCCAGAAGATGTATGTGGCAGGTCCTTGTGGAGATTTTCATCAGCATCGCTGTGAGTCCGAACTGTGCATAAGAAGTGTCTCATCCAGCATCTGCAA	ACTT	[228]
B.alternatus23CC.....		[228]
B.alternatus25CC.....		[228]
B.erythromelasACC.....T.....		[228]
B.erythromelasGCCC.....		[228]
B.jararacaA4TC.....		[228]
B.jararacaB1C.....TC.....		[228]
B.jararacussuA1CC.....C.....		[228]
B.jararacussuB11CC.....		[228]
B.moojeniA4TC.....		[228]
B.moojeniC1TC.....G.C.....		[228]
B.neuwiediD1CC.....A.....		[228]
B.neuwiediE1CC.....T.....		[228]
Lmm1CC.....		[228]
Lmm2CC.....		[228]
GloydiusCC.....G.....	[228]
ElapheG...CA.....CA...C.....G...C.....G...C.A.T...CA...T.CAGT...G.....C.....		[228]
PythonC.....CCG.....A.TC...A.A...C.CG...T...C.AG.T...T.A...G.CAC.....T.....T.....		[228]

	250	300	
C.d.terrificus(CNF)	GGGCAATTTGATGTAAATATTGGGCATCACTCATATATAAGAGGAAGAATCAATTGCTGTGAGAAAGAACTGTGTGAAGACCAACCGTTTCCAGGACTGCCCTCTCCAAACCA		[342]
B.alternatus23A.....C.....G.....CG...	[342]
B.alternatus25A.....C.....C.....CG...	[342]
B.erythromelasA2A.....A.....C.....G.....CG...	[342]
B.erythromelasG1A.....A.....G.....C.....G.....CG...	[342]
B.jararacaA4A.....G.....C.....G.....CG...	[342]
B.jararacaB1A.....C.....G.....CG...	[342]
B.jararacussuA11A.....C.....A.....CG...	[342]

B.jararacussuB11A.....C.....A.....CG.... [342]
 B.moojeniA4A.....G.....C.....G.....CG.... [342]
 B.moojeniC1CA.....C.....CG.... [342]
 B.neuwiediD1A.....A.....C.....C.....CG.... [342]
 B.neuwiediE1A.....A.....A.....C.....C.....CG.... [342]
 Lmm1C.....T..... [342]
 Lmm2A.....G.....C.....A.....CG.... [342]
 GloydusC.....A.....C.....A.....G.....C..... [342]
 ElapheA...C...C...C...C...A...GG.GA.C...C.G.....C...T...TG.A.AA.....G.GC.A...T.....C.T... [342]
 PythonC.GTG...CA.C.G.T.G.GGAGTG.....CA.....T.T.T.A.....AC...T...T.....CTC.AG [342]
 350 400 450
 C.d.terrificus (CNF) AATGGATACTATTGCCCTGGTGAATTTGGCCTTTTTACGAAGGACAGCACTGAATATGAAGCTATTTGCAAAGGAAGCTGAGACTAAGTGCATTAACATCGTGGGACACAGATATG [456]
 B.alternatus23C...T.G.....AG.....C.T.....G..... [456]
 B.alternatus25C...T.G.....AG.....C.T.....G..... [456]
 B.erythromelasA2C...T.G.....G.....C.T.....G.....C... [456]
 B.erythromelasG1C...T.G.....G.....C.T.....G.....C... [456]
 B.jararacaA4C...T.G.A.....G.....C.T.....G.....T...C... [456]
 B.jararacaB1C...T.G.A.....G.....C.T.....G.....T...C... [456]
 B.jararacussuA11C...T.G.....G.....C.T.....G..... [456]
 B.jararacussuB11C...T.G.....G.....C.T.....G..... [456]
 B.moojeniA4C...T.G.A.....G.....C.T.....G.....T...C... [456]
 B.moojeniC1C...T.G.....G.....T.....C.T.....G..... [456]
 B.neuwiediD1C...T.G.....T.G.....C.T.....G.....C... [456]
 B.neuwiediE1C...T.G.....T.G.....C.T.....G.....C... [456]
 Lmm1C.....C.....C..... [456]
 Lmm2C...T.G.....G.....C.T..... [456]
 GloydusC...C.....G.....C.....C..... [456]
 ElapheGTC...T...C.TTC...T.A.CT.AG.....G...C...GC...GAC...A.C.A.....T...T...A.A. [456]
 PythonGCT...T...TT...TA...CG.....C...T.AA...G...A...T...C.G.TC.T...T...C.A. [456]
 500 550
 C.d.terrificus (CNF) AACAAATTT-----CCTGGAGACATCTCTTACAATCTCAAAGGCTGCGTTTCTTCTGCTCTGCTGAGTTTGAGCAATGCAACCTTTGAACAAAACAGAAATTATCT [570]
 B.alternatus23 ..A.T...-----A.....CG..... [570]
 B.alternatus25 ..A.T...-----A.....G.A.CG...G..... [570]
 B.erythromelasA2 ..A.T...TTTTCTGCAGTT...A...T.A.....CG...G..... [570]
 B.erythromelasG1 ..A.T...TTTTCTGCAGTT...A...T.A.....CG...G..... [570]
 B.jararacaA4T...-----G.....CA...G..... [570]
 B.jararacaB1T...-----G.....CA...G..... [570]
 B.jararacussuA11 ..A.T...-----A.....CG...G..... [570]
 B.jararacussuB11 ..A.T...-----A.....A.CG...GC..... [570]
 B.moojeniA4T...-----G.....CA..... [570]
 B.moojeniC1 ..A.T...-----A.....CA...G..... [570]
 B.neuwiediD1 ..A.T...TTTTCTGCAGTT...A...T.A.....CG...G..... [570]
 B.neuwiediE1 ..A.T...TTTTCTGCAGTT...A...T.A.....CG...G..... [570]
 Lmm1C...----- [570]
 Lmm2 ..A.T...-----A.....CG...G..... [570]
 Gloydus ..A.T.A.-----T...CA...G..... [570]
 Elaphe ..AG...-----C...G...T.A...A.....AGAA...A.....AG...GCAC...G.CGT...G... [570]
 Python ..AGT.A.-----G...A...A...T.A...T.....CT.G.A.C...TG.AAG.GGTCA...GG.CG.A...G... [570]

C.d.terrificus(CNF)	GGAGAAAGTTGAATGTAAGGACGCCATCAGATTGGCAAGCCTCTGA	[626]
B.alternatus23	[626]
B.alternatus25	[626]
B.erythromelasA2	[626]
B.erythromelasG1	[626]
B.jararacaA4	.C.....	[626]
B.jararacaB1	.C.....	[626]
B.jararacussuA11	.C.....	[626]
B.jararacussuB11	[626]
B.moojeniA4	[626]
B.moojeniC1	.C.....	[626]
B.neuwiediD1T.....	[626]
B.neuwiediE1T.....	[626]
Lmm1	[626]
Lmm2	.C.....	[626]
GloydiusT...A.A.T...T.A....	[626]
Elaphe	.ATA.....GA.....G...A.A.TA.C-.T.....	[626]
Python	.A...G.....G...A...T.G.A.CCT...T-.....	[626]

Figura 24. Alinhamento múltiplo das seqüências de nucleotídeos codificadores dos inibidores de fosfolipase A2 da classe gama em serpentes brasileiras. CNF, um γ PLI da serpente sulamericana *C. d. terrificus* (Viperidae, Crotalinae) foi usado como referência. As seqüências de γ PLIs de *G. b. siniticus* (uma Crotalinae Asiática), *E. quadrivirgata* (Colubridae) e *P. reticulatus* (Pythonidae) foram incluídas para comparação. Uma inserção idêntica de 12 nucleotídeos aparece nos clones das serpentes *B. erythromelas* (Be γ PLI) e *B. neuwiedi* (Bn γ PLI). Nucleotídeos idênticos são indicados com pontos e *gaps* são indicados com o sinal “-”.

	10	20	30	40	50	60	70	80	90	100	
<i>C.d.terrificus</i> .CNF	MKYLHTICLLFIFVARGNS	RS	CDFCHNIGKDCD	-GYEEECSSPEDVCGKVL	LEISSASLSV	RTVHKNCFS	SSSICKLGQF	VDVNIGHHSY	IRGRINCCEKEL	CEDQ	[104]
<i>Lm.muta1</i>	.S.....			..Q.....	F.....		I.....	V.....		P....	[104]
<i>L.m.muta2</i>Q.....	F.....		I.....	V.....		P....	[104]
<i>B.alternatus1</i>	.S.....		V..	..Q.....	F.....		I.....			P....	[104]
<i>B.alternatus2</i>	.S.....		V..	..Q.....	F.....		I.....			P....	[104]
<i>B.erythromelas1</i>	.S.....		L..E..	..Q.....	F.....		I.....	Q.....		P....	[104]
<i>B.erythromelas2</i>	.S.....		L..	..Q.....	FP.....		I.....	Q...G.....		P....	[104]
<i>B.jararaca1</i>	.S.....			..QQ.....	F.....		I.....		G.....	P....	[104]
<i>B.jararaca2</i>	.S.....	I.....		..QQ.....	A.F.....		I.....			P....	[104]
<i>B.jararacussu1</i>	.S.....			..Q.....	F.TA.....		I.....			P....	[104]
<i>B.jararacussu2</i>	.S.....			..Q.....	F.P.....		I.....			P....	[104]
<i>B.moojeni1</i>	.S.....			..QQ.....	F.....		I.....		G.....	P....	[104]
<i>B.moojeni2</i>	.S.....			..QQ.....	F.V.....		HI.....			P....	[104]
<i>B.neuwiedi1</i>	.S.....		L..	..Q.....	F.....		I.....	Q.....		P....	[104]
<i>B.neuwiedi2</i>	.S.....			V..	..Q.....		F.....	I.....	Q...R.....	P....	[104]
<i>G.b.siniticus</i>	.S.....	I.....	Y.....	..H.....	F.....		V.....	H.I.....		P....	[104]
<i>E.quadrivirgata</i>	.S.QI.....	SC.....	EI..V.N.	GYD.V..H..	Q.....		P.ISS.R.....	L..EH...T.QET.L...	H..DEKK..GR	[104]	
<i>P.reticulatus</i>	.S.Q.....	I...T	DK.EI..GF.D...	..Q...P...R...I.ID.AL.PV.F.AT.....				RV.IHVWDGV.....T...DNDQ....		[104]	

	110	120	130	140	150	160	170	180	190	200	
<i>C.d.terrificus</i> .CNF	PFPGLPLSKPNGYICPGAIGLFTKDS	TEYEAI	CKGTE	TKCINIVGHR	YEQF----	PGDISYNLKGCVSSCPLLSLS	SNATFEQNRN	YLEKVECKDAIRL	SL-	[206]	
<i>Lm.muta1</i>R.....	L..E.....	H.....	N-----	T.....		R.E.....	Q.....		[206]	
<i>L.m.muta2</i>	L.....		Q.....		P-----					[206]	
<i>B.alternatusA2</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	N-----	T.....	R.....			[206]	
<i>B.alternatusB2</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	N-----	T.....	NR.E.....			[206]	
<i>B.erythromelasA2</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	H.N.FSAV.E.FT.....		R.E.....			[206]	
<i>B.erythromelasG1</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	H.N.FSAV.E.FT.....		R.E.....			[206]	
<i>B.jararacaA4</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	H.H.----A.....		H.E.....	Q.....		[206]	
<i>B.jararacaB1</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	H.H.----A.....		H.E.....	Q.....		[206]	
<i>B.jararacussuB11</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	N-----	T.....	R.E.....	Q.....		[206]	
<i>B.jararacussuA11</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	N-----	T.....	R.E.....	Q.....		[206]	
<i>B.moojeniA4</i>R.....	L..E.....	H.....	D.....	H.H.----A.....		H.....			[206]	
<i>B.moojeniC1</i>R.....	L..E.....	F..H.....	D.....	N-----	T.....	H.E.....	Q.....		[206]	
<i>B.neuwiediD1</i>R.....	L..SE.....	H.....	D.....	H.N.FSAV.E.FT.....		R.E.....			[206]	
<i>B.neuwiediE1</i>R.....	L..SE.....	H.....	D.....	H.N.FSAV.E.FT.....		R.E.....			[206]	
<i>G.b.siniticus</i>Q.....	L..E.....		H.NY----			S.H.E.....		FKI..H-	[206]	
<i>E.quadrivirgata</i>H...V..VL..SE..S.S.A..D.....		Y.K.R.----	A..I.....	E.R..R.H.ER..D.I...R.VKITPSE		[206]				
<i>P.reticulatus</i>	.L.....LQ..L.....F.I..E.....H.VK.R...M.LDL..Y.Q.SY----	A.N.T..I.....	VT..ERGH.GRK.D.K...RE.LKP..SD		[206]						

Figura 25. Alinhamento das estruturas primárias deduzidas de γ PLIs das serpentes brasileiras. CNF foi usado como referência. Uma inserção de 4 resíduos (correspondendo ao peptídeo F¹⁵⁴S¹⁵⁵A¹⁵⁶V¹⁵⁷) aparece nas sequências de B γ PLI e Bn γ PLI. Aminoácidos idênticos são mostrados por pontos e *gaps* são indicados com o sinal “-“. O peptídeo sinal (19 resíduos) está colorido em cinza.

6.2.4. Análise das mutações detectadas nas seqüências nucleotídicas dos novos γ PLIs

Um número considerável de mutações sinônimas ou não (Tabela 5) foram observadas nas seqüências dos inibidores gama. O maior número de mutações ocorreu para as espécies não viperídeas do Velho Mundo (*E. quadrivirgata* e *P. reticulatus*). Entre as serpentes brasileiras o maior número de mutações ocorreu nas espécies *B. erythromelas* e *B. newwiedi*, devido à inserção de 4 resíduos.

As seqüências da espécie *L. muta* são interessantes por dois motivos: um dos clones (Lmm1) apresenta apenas 2 mutações sinônimas quando comparado ao γ PLI de *C. d. terrificus*. Além disso, podemos observar que as mutações entre as seqüências Lmm1 e Lmm2, apresentam o maior número de substituições, sinônimas (2 *versus* 8) e não-sinônimas (4 *versus* 15), dentre todas as serpentes analisadas.

Tabela 5. Número e tipo de mutações em nucleotídeos de γ PLIs, relativos à CNF de *C. d. terrificus*

Seqüências	Nucleotídeos			
	Não-sinônimas	Sinônimas	mutados	
	Número (Dn)	Número (Ds)	NºTotal	Dn/Ds
<i>B. alternatus</i> A1	14	9	23	1,5
<i>B. alternatus</i> B1	16	10	26	1,6
<i>B. erythromelas</i> A2	24	17	41	1,4
<i>B. erythromelas</i> G1	25	17	42	1,5
<i>B. jararaca</i> A4	18	9	27	2,0
<i>B. jararaca</i> B1	19	10	29	1,9
<i>B. jararacussu</i> A11	16	8	24	2,0
<i>B. jararacussu</i> B11	15	9	24	1,7
<i>B. moojeni</i> A4	16	9	25	1,8
<i>B. moojeni</i> C1	19	8	27	2,4
<i>B. neuwiedi</i> D1	24	19	43	1,3
<i>B. neuwiedi</i> E1	25	20	45	1,3
<i>E. quadrivirgata</i>	65	67	132	1,0
<i>G. b. siniticus</i>	22	9	31	2,4
<i>L. m. muta</i> 1	4	2	6	2,0
<i>L. m. muta</i> 2	15	8	23	1,8
<i>P. reticulatus</i>	78	72	150	1,1

Três espécies de serpentes do Velho Mundo, *G. b. siniticus* (Viperidae, Crotalinae), *E. quadrivirgata* (Colubridae) e *P. reticulatus* (Pythonidae), foram incluídas para comparação.

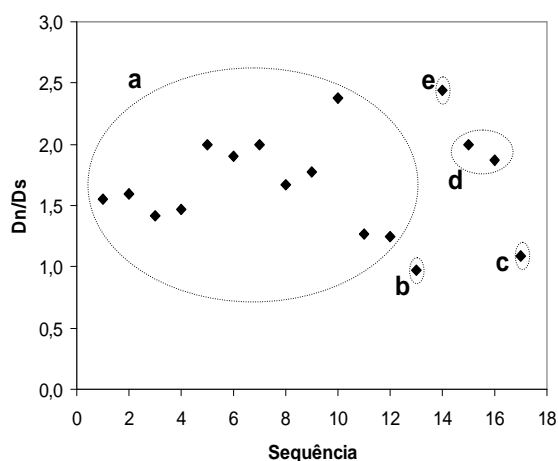


Figura 26. Representação gráfica relação Dn/Ds para as mutações nucleotídicas dos γ PLIs. Em (a) serpentes botrópicas, (b) *E. quadrivirgata*, (c) *G. b. siniticus*, (d) *L. muta* e (e) *P. reticulatus*.

6.2.5. Análise filogenética para γ PLIs

Baseado nas seqüências nucleotídicas das γ PLIs das serpentes foi gerada uma árvore filogenética Bayesiana para o inibidor gama. A fim de comparação com as serpentes brasileiras, foram incluídas as seguintes serpentes do Velho Mundo: *G. b. siniticus* (Viperidae, Crotalinae), *P. reticulatus* (Pythonidae) e *E. quadrivirgata* (Colubridae). O cladograma resultante (Figura 27) mostra quatro agrupamentos entre as espécies: 1. *L. muta* e *B. jararacussu*, 2. *B. alternatus*, 3. *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*, 4. *B. jararaca* e *B. moojeni*.

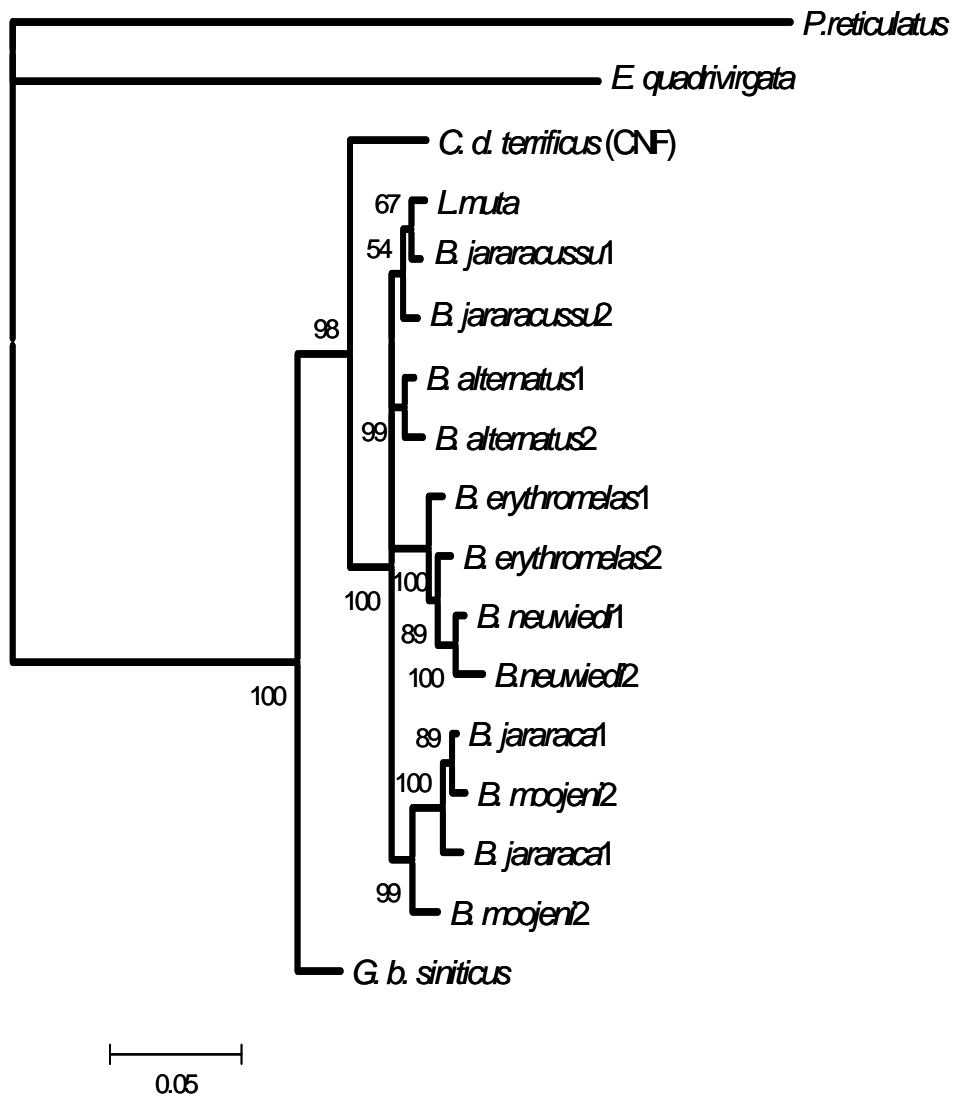


Figura 27. Árvore filogenética Bayesiana de γ PLIs de serpentes da subfamília Crotalinae (gêneros *Bothrops*, *Lachesis* e *Crotalus*). Foram incluídas as seguintes serpentes do Velho Mundo: *G. b. siniticus* (Viperidae, Crotalinae), *P. reticulatus* (Pythonidae) e *E. quadrivirgata* (Colubridae). Os valores de Bootstrap estão indicados nos ramos.

6.2.6. Características dos inibidores gama

As massas moleculares e pontos isoelétricos (pIs) foram calculados a partir das estruturas primárias deduzidas das proteínas maduras. Todas as moléculas apresentam pontos isoelétricos variando entre 4,94 (B.erythromelas_A2) e 5,74 (Lmm2). As massas moleculares variaram entre 19.936,00 (B.moojeni_C1) e 20635.69 (B.neuwiedi_E1).

6.2.7. Análises de modificações pós-traducionais

As análises de predições pós-traducionais foram realizadas sem o peptídeo sinal das proteínas. Foram preditos sítios potenciais de N-glicosilação e de fosforilação para os resíduos Serina, Tirosina e Treonina para cada seqüência gerada.

Sítios potenciais de N-glicosilação

Os inibidores da classe gama apresentaram sítios potenciais de N-glicosilação no resíduo 176, exceto nas seqüências de *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*, onde os sítios de N-glicosilação se encontram no resíduo 180.

Predição de sítios de fosforilação

Os inibidores da classe gama apresentaram pelo menos 2 sítios de fosforilação para serina e tirosina quinase, enquanto que sítios para treonina quinase foram encontrados apenas nas seqüências de *B. neuwiedi* (Tabela 6).

Tabela 6. Sítios de fosforilação preditos para γ PLIs de serpentes Crotalinae brasileiras

Proteína	Posição	Resíduo alvo	Seqüência consenso	Score
CNF	22	S	QECSSPEDV	0.997
	16	Y	DCDGYEQEC	0.973
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952
Lmm1/2	22	S	EECSSPEDV	0.997
	16	Y	DCDGYEEEC	0.974
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952
B.alternatus1/2	22	S	QECSSPEDV	0.997
	16	Y	DCDGYEQEC	0.973
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952
B.erythromelas1/2	22	S	QECSSPEDV	0.997
	16	Y	DCDGYEQEC	0.973
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952
B.jararaca1/2	22	S	QECSSPEDV	0.996
	16	Y	DCDGYEQEC	0.942
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952
B.jararacussu1/2	22	S	QECSSPEDV	0.997
	16	Y	DCDGYEQEC	0.973
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952
B.moojeni1	22	S	QECSSPEDV	0.996
	16	Y	DCDGYEQEC	0.942
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952
B.moojeni2	22	S	QECSSPEDV	0.996
	16	Y	DCDGYEQEC	0.942
B.neuwiedi1/2	22	S	QECSSPEDV	0.997
	111	T	SEDSTEYEA	0.904
	16	Y	DCDGYEQEC	0.973
	113	Y	DSTEYEAIC	0.952

6.2.8. Análise de estruturas secundárias em inibidores gama

As proteínas da classe gama apresentam apenas uma região de α -hélice (entre os resíduos 159 até 167) com consenso entre apenas dois programas. Fitas- β , entretanto estão presentes em vários segmentos das moléculas. Os resíduos de aminoácidos extras das seqüências de *B. erythromelas* e *B. newwiedi* não resultaram em qualquer predição de estrutura secundária. O resultado da predição das estruturas secundárias obtidos para os inibidores da classe gama, é mostrado na Figura 28.

6.2.9. Pesquisa de domínios conservados para inibidores gama

A busca por domínios conservados nas seqüências dos γ PLIs foi realizada através do BLASTp no Genbank e do InterProScan no InterPro, conforme descrito na metodologia. Os resultados obtidos indicam uma significativa similaridade dos γ PLIs seqüenciados neste estudo com a proteína CD59 (identificação no banco de dados do PDB:1erg). A Figura 29 é mostrada para exemplificar os dados de saída no Genbank e no InterPro quando a seqüência (aBj_02) de *B. jararaca* foi usada na pesquisa.

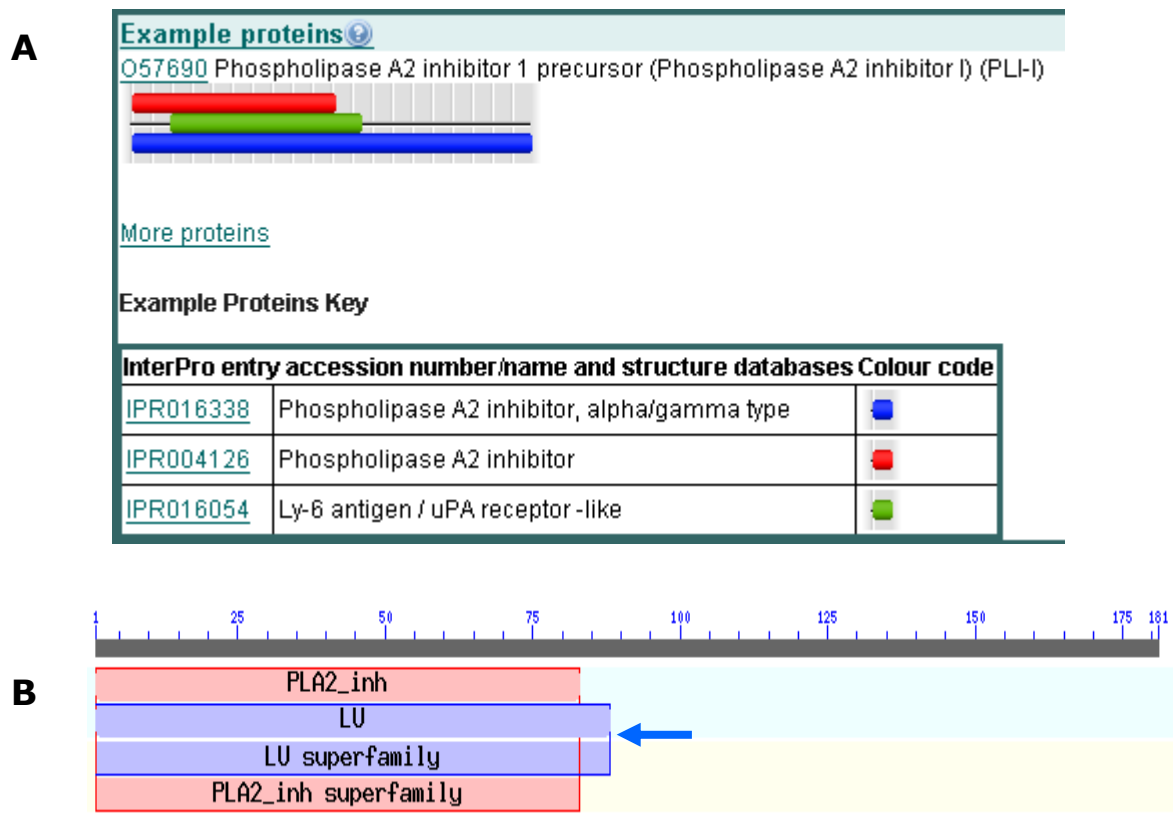


Figura 29. Pesquisa de domínios conservados na estrutura de um γ PLI. A seqüência aBj_02 foi usada como entrada (*query*). Na figura é mostrado o resultado gerado pelo InterProScan onde as cores azul e vermelho mostram o domínio de inibidor de fosfolipase da classe gama (A) e o resultado da pesquisa no Genbank (B). A região identificada como “PLA2_inh” se refere ao segmento da proteína que apresenta o domínio conservado dos inibidores de fosfolipase A₂. Este domínio é similar ao das neurotoxinas de venenos de serpentes (seta) (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Structure/cdd/cddsrv.cgi>).

6.2.10. Um modelo tridimensional para inibidores gama

As supostas estruturas tridimensionais das proteínas dos γ PLIs de *B. jararaca* e *B. neuwiedi* foram modeladas por homologia utilizando o programa Modeller 9.0v3. A estrutura do antígeno CD59 (PDB:1erg), foi escolhida como modelo, uma vez que esta apresenta alta similaridade com as γ PLIs, conforme verificado pelo alinhamento das seqüências no PDB.

Para os inibidores gama foram gerados dois modelos (Figura 30), sendo que um deles representa as seqüências contendo a inserção de 4 resíduos de aminoácidos, vistas em *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*. Os modelos 3D gerados para os inibidores γ PLIs foram submetidos ao programa PROCHECK para análise de impedimento estereo-químico. De acordo com o programa, 83% dos resíduos se encontram em regiões favoráveis (Figura31).

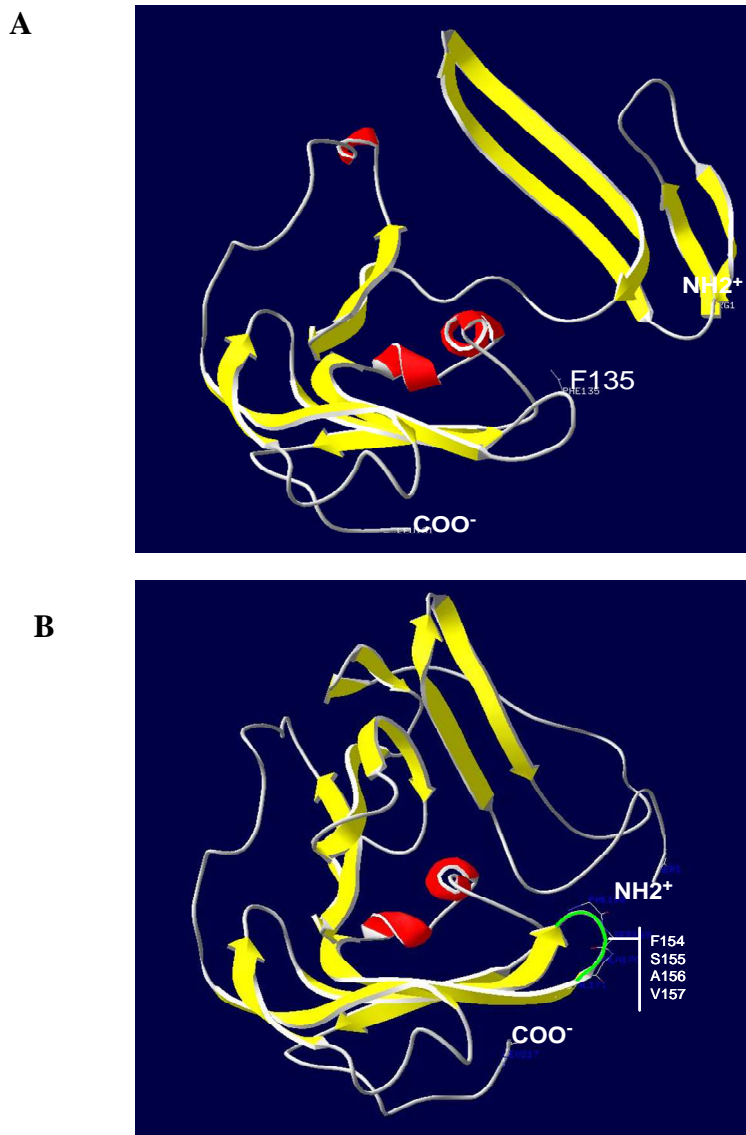


Figura 30. Modelo 3D para os inibidores gama gerados por homologia à proteína CD59 (PDB:1erg). A – Modelo gerado para o γ PLI de *B. jararaca* (clone B1). O aminoácido marcado (F153) representa o local do início da inserção de aminoácidos vista nas seqüências de *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*; B - Modelo gerado para os γ PLIs contendo a inserção de 4 resíduos de aminoácidos (região em verde). As α -hélices estão coloridas em vermelho e as folhas- β em amarelo.

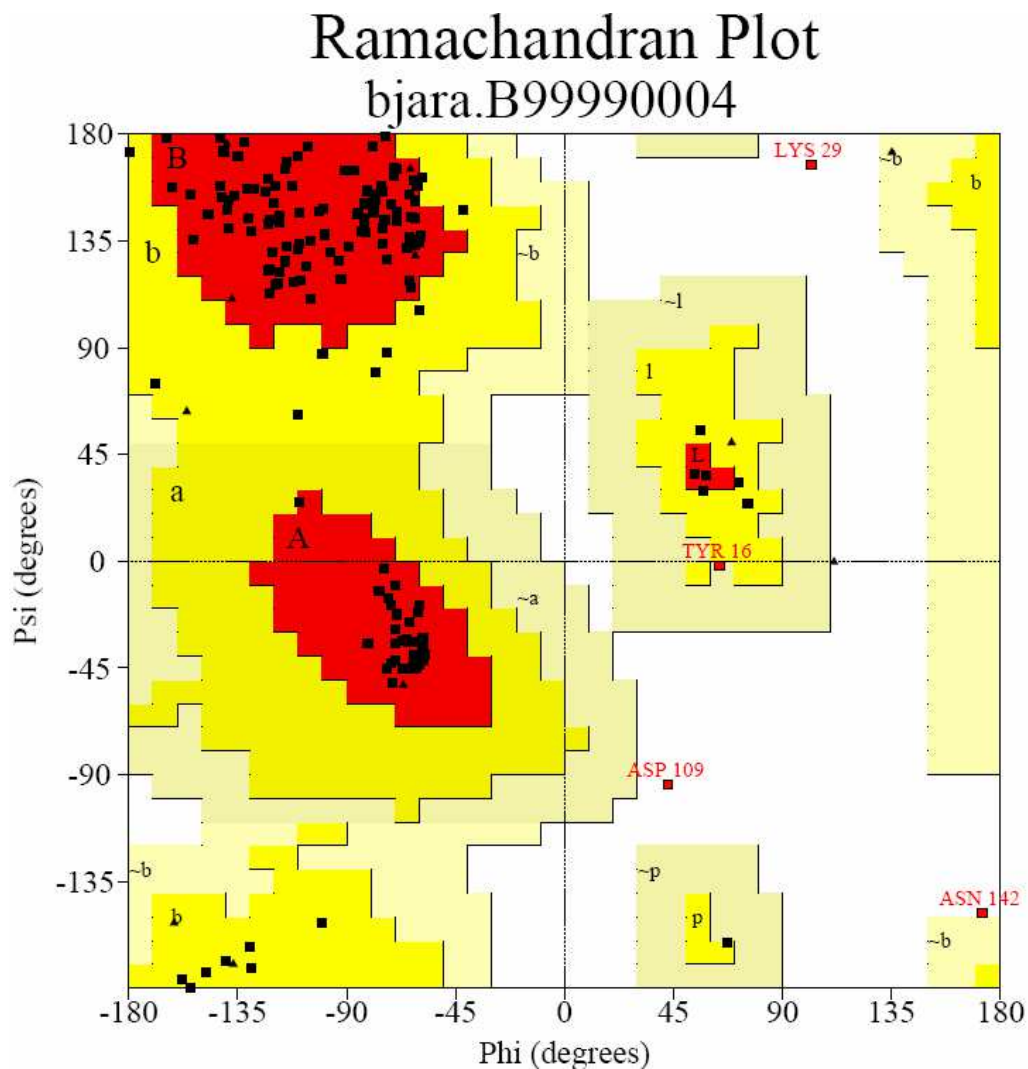


Figura 31. Plot de Ramachandran gerado pelo PROCHECK durante avaliação da qualidade do modelo 3D produzido para o γ PLI. Resíduos em regiões mais favoráveis [A,B,L] 131 (84.5%); Resíduos em regiões permitidas adicionais [a,b,l,p] 20 (12.9%); Resíduos em regiões fracamente permitidas [\sim a, \sim b, \sim l, \sim p] 1 (0.6%); Resíduos em regiões não permitidas 3 (1.9%).

7. DISCUSSÃO

7.1. INIBIDORES ALFA (α PLIS)

A presença de cDNA codificador de α PLIs foi detectada no fígado de 8 espécies de serpentes Crotalinae brasileiras pesquisadas (Figura 7). Foram encontrados produtos de amplificação dos tamanhos esperados: 730pb e 415pb, correspondendo aos tamanhos compatíveis com os segmentos 5'UTR/carboxi-terminal e proteína madura/carboxi-terminal, respectivamente, quando comparado ao inibidor alfa de *G. b. siniticus*. Esta serpente foi usada como referência por ser, à época do início deste projeto, a única reportada que apresentava as três classes de inibidores seqüenciados na mesma espécie. Assim, a seqüência de seu α PLI foi usada para o desenho dos iniciadores em nossos estudos. Os resultados finais confirmaram a presença de cDNA codificador de α PLIs nas espécies *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *C. d. terrificus* e *L. muta*.

O mais surpreendente resultado do alinhamento das seqüências nucleotídicas de α PLIs das serpentes estudadas é a variabilidade existente nos genes, cujas proteínas supostamente desempenham a mesma função. Como a seqüência de referência pertence a outro gênero, seria esperado que um grande número de variações ocorressem. Entretanto, a espécie *G. b. siniticus* foi escolhida como referência, justamente por ser esta a que mais frequentemente apresentava alta similaridade com as seqüências aqui obtidas à época do início deste trabalho.

Quando realizamos estudos de predição de estrutura secundária, foi possível verificar que as α PLIs não apresentam variabilidade estrutural secundária significativa. Ao contrário, se mostram bastante conservadas, sendo que a maioria das regiões de α -hélice e fitas- β são comuns. É provável que as funções dessas moléculas não sejam afetadas pelas diferenças

de aminoácidos resultantes de mutações não sinônimas ou que as mutações sejam a forma de adequação do inibidor ao ligante em cada espécie.

Mutações sinônimas estão presentes em aproximadamente 22 códons em cada seqüência, contra uma média de 30 mutações não sinônimas (Tabela 3). Encontramos na literatura, a seqüência da proteína BmjMIP, isolada por Soares e cols. (2003) da serpente *B. moojeni*, mas decidimos não incluí-la em nossas análises, devido à grande divergência que apresenta em relação às estudadas aqui.

A seqüência de *E. quadrivirgata*, uma serpente da família Colubridae usada como grupo externo em nosso estudo, apresenta cerca de 48 mutações não sinônimas, o maior número verificado em nosso trabalho. Esta proteína é especialmente interessante, pois embora apresente similaridade estrutural comparável aos PLIs, ela é carente de atividade inibitória sobre as sPLA₂. Okumura e cols. (2003) ao analisarem a seqüência dessa proteína, verificaram que vários resíduos são diferentes das outras PLIs usadas para comparação. Àquela época, apenas 4 seqüências de PLIs estavam disponíveis. Entretanto, neste trabalho, esta mesma seqüência foi comparada a um número muito maior de seqüências (43) e foi possível verificar que ainda assim, a proteína de *E. quadrivirgata*, apresenta aminoácidos únicos em sua seqüência.

Nobuhisa e cols. (1989) sugeriram que os 12 resíduos C-terminais são essenciais para a interação α PLI-PLA₂. Interessantemente, podemos verificar que estes resíduos são quase completamente conservados, exceto pela posição I¹⁶⁵ que é substituído pelo M¹⁶⁵ em todas as seqüências de *B. jararacussu*, e por Y¹⁶⁵ em uma das seqüências de *B. jararaca* (Figura 9). Outros pontos a serem observados é a substituição da Y¹⁴⁶ por S¹⁴⁶ e a deleção do resíduo Leucina C-terminal na seqüência de *E. quadrivirgata*. Esta deleção aparece também em uma das seqüências de *C. d. terrificus* (B4).

É possível que resíduos críticos para a ligação com PLA₂ tenham sido substituídos por resíduos que aparecem apenas na seqüência de *E. quadrivirgata*. Seria informativo testar a

atividade inibitória dos inibidores das serpentes brasileiras cujos resíduos C-terminais apresentaram diferenças relativas às seqüências da grande maioria dos inibidores.

Embora o número de espécies de serpentes disponíveis em nosso trabalho seja limitado, produzimos uma árvore filogenética baseada nas seqüências dos PLIs. A árvore filogenética gerada para inibidores alfa apresenta alguns agrupamentos principais (Figura 11). As seqüências de *B. neuwiedi* foram as que menos se agruparam em conjunto e se misturaram entre as de *B. jararacussu*. Esta inconsistência entre a separação das seqüências de *B. neuwiedi*, talvez possa ser explicada pela dificuldade que os especialistas encontram na classificação desta espécie (Cota, comunicação pessoal). Segundo Valdujo e cols. (2002), *B. neuwiedi* compõe um complexo atualmente constituído por 12 subespécies, as quais se encontram em fase de reavaliação taxonômica.

Devido ao fato de todos os PLIs já relatados até hoje sejam descritos como glicosilados, foi feita a predição de sítios de N-glicosilação. A predição de sítios de N-glicosilação para inibidores α PLIs resultou negativa na maioria das seqüências, com exceção de duas seqüências de *B. neuwiedi* e todas as de *B. alternatus* e *B. erythromelas*, as quais apresentaram sítio potencial na posição 61 (seqüência: N⁶¹G⁶²S⁶³E⁶⁴, incluindo-se o peptídeo sinal). Esta posição é diferente daquela encontrada para as seqüências de α PLIs, onde o potencial sítio de glicosilação ocorre na posição N103, característico dos α PLIs nativos já descritos (Okumura e cols., 1999, 2003; Lizano e cols., 2000; Quirós e cols., 2007).

Tendo em vista que as sPLA₂ exercem um grande número de funções fisiopatológicas, que sua interação com as moléculas de PLIs ainda não foi esclarecida e que os PLIs possivelmente exercem um papel adicional além daquele de proteção contra as sPLA₂ tóxicas das serpentes, decidimos realizar uma busca por potenciais sítios de fosforilação nessas moléculas. Verificamos que no caso dos α PLIs, estes sítios apresentaram o mesmo padrão em todas as seqüências de inibidores estudadas, sendo que sítios para treonina-

quinase foram encontrados nas seqüências de pelo menos um clone de *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. neuwiedi* e *C. d. terrificus*.

Como já comentado anteriormente na introdução (ítem 1.4), os PLIs de serpentes são oligômeros compostos por subunidades ligadas não covalentemente, as quais formam complexos funcionais com as svPLA₂ (Hains e cols., 2000; Okhura e cols., 2008). Usualmente estas subunidades são diferentes, o que resultaria em variadas características de estrutura secundária e terciária e uma maior dificuldade no entendimento das interações entre estas moléculas, tanto entre si mesmas, quanto com os ligantes. Assim, realizamos tentativas de elucidação das estruturas secundárias (Figura 13), bem como a modelagem tridimensional por homologia de um monômero (Figuras 14 e 16).

A pesquisa por domínios conservados realizado através de BLASTp no (NCBI:) resultou no encontro de similaridade com a superfamília de proteínas tipo-colectinas (do inglês CLECT), incluindo aquelas com domínio semelhante à lectina tipo-C (CTLD) encontrado em colectinas humanas como as proteínas surfactantes pulmonares A e D, lectinas ligantes de manose (MBL) e CL-L1 (colectina1 de fígado). CTLD refere-se a domínios homólogos aos de reconhecimento de carboidrato das lectinas tipo-C (CRDs). Os CTLDs das colectinas ligam carboidratos da superfície de patógenos ou células apoptóticas e mediam funções associadas com a morte celular e fagocitose, através da ativação do complemento. Proteínas ligantes de manose reconhecem o oligossacarídeo manose de maneira dependente de cálcio. A SP-A e SP-D são proteínas compostas por homotrímeros que além de atuar como componentes na defesa do hospedeiro são também componentes do surfactante pulmonar (um complexo fosfolipídeo-proteína o que reduz a tensão superficial dentro dos pulmões). A deficiência destas proteínas resulta em aumento da susceptibilidade à infecções e doenças inflamatórias, como a artrite reumatóide.

A estrutura secundária de um dos homólogos dos inibidores α PLI foi predita por meio de três diferentes programas computacionais para que o resultado apresentasse maior grau de

confiança, e o consenso entre eles foi obtido. Quando observamos a estrutura secundária dos α PLIs verificamos que ocorrem regiões comuns de α -hélices e fitas- β em todas as proteínas, sugerindo uma estrutura tridimensional similar.

Em nosso trabalho, escolhemos aleatoriamente uma molécula de α PLI para gerar uma estrutura tridimensional. A estrutura primária da proteína deduzida a ser modelada - Lm3 α PLI (clone 3 do inibidor de *Lachesis muta*), mostrou alta similaridade com a proteína do surfactante pulmonar de ratos (SP-A) e o receptor tipo-M de sPLA₂ (Drickamer e cols., 1986; Lambeau e cols., 1999), quando da pesquisa de similaridade no banco de dados do PDB. A seqüência da proteína escolhida como modelo “SP-A” de ratos e a seqüência de Lm3 α PLI apresentam apenas 40% de identidade de aminoácidos, o que dificultou a produção da estrutura 3D para o Lm3 α PLI.

Quando submetemos nosso modelo ao programa PROCHECK, para análise de impedimento estereo-químico, obtivemos um Plot de Ramandram o qual mostra que mais de 90% dos resíduos se encontram em regiões favoráveis de energia, e apenas ,,,,,,, % de resíduos em regiões não permitidas. Estes dados, portanto, caracterizam nosso modelo como um bom modelo. Okumura e cols. (2005) já haviam anteriormente proposto a estrutura 3-D para esta classe de proteínas, sugerindo uma interação entre as 3 subunidades para a formação do complexo α PLI-sPLA₂, onde a molécula de PLA₂ iria ocupar o poro central do trímero de subunidades do inibidor (Figura 16). Nosso modelo foi comparado com o modelo proposto por Okumura e cols. (2005), e verificamos uma grande semelhança no enovelamento global entre eles (Figura 16).

A expressão de um inibidor alfa não havia sido tentada anteriormente em nosso laboratório, ao contrário do inibidor da classe gama. Sendo assim, realizamos uma tentativa de expressão de uma destas moléculas em bactérias, para a qual obtivemos sucesso. Experimentos de expressão da proteína recombinante induzida com IPTG foi

acompanhada por meio de eletroforese em SDS-PAGE. O gel mostrou um aumento da quantidade de proteína até 4 horas após o início da indução (Figura 18). A partir daí este tempo foi padronizado para os experimentos de expressão seguintes, quando foi conduzida a expressão de proteínas recombinantes em maior escala, visando a purificação destas proteínas. Foi anteriormente verificado que as proteínas expressas estavam presentes tanto no sobrenadante quanto no *pellet* do lisado da cultura bacteriana (Figura 19). Assim, os experimentos de purificação das proteínas foram realizados para ambas as condições.

Para a purificação das proteínas recombinantes, foram utilizados dois sistemas cromatográficos, ambos baseados em resina de afinidade. Primeiramente foram utilizadas colunas de quelação ao metal, onde se verificou que as proteínas eram obtidas com gradiente de 100% de imidazol (Figura 20), tanto para aquelas provenientes do sobrenadante do lisado, quanto para aquelas provenientes do *pellet* bacteriano. Em seguida, a purificação de um α PLI recombinante foi conduzida, a partir do sobrenadante, em coluna de afinidade sepharose-Bothropstoxina-I. Para estes experimentos, uma sPLA₂ miotóxica (Bothropstoxina I) foi purificada do veneno da serpente *B. jararacussu*. Esta miotoxina foi escolhida para a realização dos experimentos, devido à disponibilidade do veneno em nosso laboratório, bem como pela facilidade de purificação desta proteína. Em apenas dois passos cromatográficos obtivemos a miotoxina pura o suficiente para a realização dos experimentos (Figura 20).

Tendo em vista a pouca quantidade da proteína recombinante Cdt- α PLI em cultura, a obtenção da proteína em rendimento suficiente para análise (Figura 22) só foi possível após vários ciclos cromatográficos. A coluna de afinidade sepharose-Bothropstoxina-I deverá também ser utilizada para a purificação de pelo menos um α PLI nativo, a ser utilizado como referência em nossas pesquisas, em testes de funcionalidade das proteínas recombinantes.

7.2. INIBIDORES GAMA (γ PLIs)

Para a classe gama foram encontrados produtos de amplificação de γ PLIs nas seis espécies do gênero *Bothrops*: *B. alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, e *B. neuwiedi*. A proteína γ PLI da espécie *Crotalus durissus terrificus*, denominado CNF, já havia sido sequenciada anteriormente por Fortes-Dias e cols (1994) enquanto que as seqüências de *Lachesis muta* foram produzidas por Fortes-Dias e cols (2003).

Os produtos de amplificação apresentaram os tamanhos esperados de 545pb e 860pb, em todas as espécies estudadas (Figura 23), correspondendo aos tamanhos compatíveis com os segmentos amino-terminal/carboxi-terminal e 5'UTR/carboxi-terminal, respectivamente.

As seqüências nucleotídicas dos novos γ PLIs das serpentes *Bothrops* foram alinhadas contra a seqüência do CNF, juntamente com seqüências publicadas na literatura para γ PLIs de espécies de serpentes do Velho Mundo (Figura 24). Um alto grau de similaridade foi compartilhado entre todas elas, embora esteja presente um número considerável de mutações sinônimas ou não (Tabela 5). Bastante interessante foi a inserção idêntica de 12 nucleotídeos que aparecem nas seqüências de *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*, nas posições 466 a 477. O maior número de mutações sinônimas e não sinônimas em relação à CNF, ocorreu para espécies não viperídeas do Velho Mundo (*E. quadrivirgata* e *P. reticulatus*).

As estruturas primárias deduzidas para os γ PLIs das serpentes *Bothrops* são mostradas na Figura 25. Os peptídeos sinal com 19 resíduos apresentaram estrutura altamente similar em todas as seqüências. As proteínas maduras apresentaram 181 resíduos, exceto para *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*, que apresentaram uma inserção idêntica de 4 resíduos (F¹⁵⁴S¹⁵⁵A¹⁵⁶V¹⁵⁷). A importância dos 4 resíduos inseridos nos γ PLIs de *B. neuwiedi* e *B. erythromelas* ainda não foi determinada.

Para a construção das árvores filogenéticas entre os PLIs da classe gama, uma árvore Bayesiana foi construída e, a partir dela, foram obtidos quatro agrupamentos das seguintes espécies: 1. *L. muta* e *B. jararacussu*, 2. *B. alternatus*, 3. *B. erythromelas* e *B. neuwiedi*, 4. *B. jararaca* e *B. moojeni* (Figura 27). Nós procuramos na literatura por árvores filogenéticas, especialmente de espécies *Bothrops*, e encontramos apenas três. Mesmo assim, elas foram derivadas através de estudos comportamentais, morfológicos ou de características moleculares (Castoe e Parkinson, 2006; Martins e cols., 2001; Wüster e cols., 2002). Recentemente uma árvore filogenética foi derivada para serpentes do gênero *Bothrops* baseada em amplificação ao acaso de DNA, o método RAPD – Amplificação de Polimorfismo de DNA. Entretanto nossos dados não são comparáveis devido ao diferente número de espécies empregadas (10 contra 6 em nosso estudo) (Grazziotin e Echeverrigaray, 2005). Embora o número global de indivíduos e as espécies não fossem comparáveis aos nossos estudos, todas as árvores geradas alocaram *B. erythromelas* e *B. neuwiedi* na mesma clade. Outra observação importante foi que, tanto *B. jararaca* quanto *B. moojeni*, quando juntas em uma clade, como a do nosso estudo, correspondem à serpentes de habitat semi-arboreal e não de habitat terrestre, sendo que estas últimas se agrupam em clades distintas.

Usando programas computacionais, os inibidores γ PLIs tiveram predição de modificações pós-traducionais como potenciais sítios de glicosilação e de fosforilação pesquisados, da mesma forma como realizada para a classe alfa. A maioria das seqüências dos γ PLIs apresentou um sítio potencial para N-glicosilação no resíduo 176. Nas seqüências de *B. erythromelas* e *B. neuwiedi* este sítio estava posicionado no resíduo 180, devido à inserção de 4 resíduos. No caso da predição para sítios de fosforilação em γ PLIs, verificamos a ocorrência de pelo menos 2 sítios para serina e/ou tirosina quinase, exceto na seqüência de *B. neuwiedi* que apresentou, além destes, sítios para treonina em ambos os clones.

Predição de estruturas secundárias nas estruturas primárias dos γ PLIs é mostrada na Figura 28. Podemos observar que a alta similaridade entre as seqüências proporcionou padrões bastante semelhantes quando suas estruturas secundárias são deduzidas. As folhas β e “random coils” ocuparam as mesmas posições, enquanto apenas uma região de α -hélice aparece próxima à região carboxi-terminal das proteínas, nas posições 159 a 167. A falta de predição para os quatro resíduos de aminoácidos inseridos nos clones de *B. erythromelas* e *B. neuwiedi* foi também consensual entre os três programas utilizados. No caso dos γ PLIs brasileiros, a única região de α -hélice predita obteve concordância de apenas dois dos programas utilizados. Um padrão de estruturas secundárias semelhante foi encontrado para a proteína NSI, inibidor gama da serpente australiana *Notechis scutatus*. O inibidor NSI é composto por 2 subunidades iguais e uma diferente, sendo que as cadeias- α das subunidades iguais são compostas inteiramente de fitas- β com oito a nove segmentos preditos (Hains e cols., 2001).

Os inibidores gama mostraram conter domínios conservados similares aos da superfamília Ly6, como também o receptor do ativador de plasminogênio tipo uroquinase (uPAR) e a proteína do sistema imune CD59 a qual é responsável pela proteção das células contra a lise mediada pelo complemento. Esta proteína apresenta a topologia das neurotoxinas de venenos de serpentes, segundo anotação do PDB onde é identificada como 1erg. Uma observação interessante foi fato dos inibidores gama serem apontados pelos bancos de dados GenBank e PDB como uma superfamília (Figura 29).

Assim como para α PLIs, os inibidores da classe gama tiveram sua estrutura tridimensional modelada por homologia. A sugestão dos modelos para representantes com e sem a inserção de 4 resíduos de aminoácidos são mostradas na Figura 30 (A e B). Podemos observar que as inserções de aminoácidos vistas nas seqüências de *B. erythromelas* e *B. neuwiedi* aparecem como *random coil*. Infelizmente, também não foram encontradas

estruturas homólogas cristalizadas para serem utilizadas como modelo. Ainda assim, de acordo com a análise dos modelos pelo programa PROCHECK, podemos inferir que nosso modelo se mostrou razoável, com 83,3 % dos resíduos em regiões permitidas. Segundo avaliação do PROCHECK, um bom modelo apresenta mais de 90% dos resíduos em posições permitidas. Como os γ PLIs são também compostos por subunidades, muitas vezes diferentes, é difícil a inferência do complexo funcional nativo (Hains e cols., 2001), bem como do complexo γ PLI-sPLA₂. Sendo assim, experimentos visando a obtenção de proteína em quantidade suficiente para cristalização destas moléculas e, por conseguinte a elucidação de sua estrutura 3D, estão em andamento.

Em nosso laboratório foi realizada uma primeira tentativa de expressão do inibidor gama em sistema de expressão eucariota, usando células de mamíferos, na expectativa de obtenção de CNFr funcional em maior quantidade. Vários testes foram realizados para a padronização das condições de transfecção do plasmídeo, mas até agora não foi obtido sucesso.

7.3. As fosfolipases A₂ e os inibidores das classes alfa e gama

Considerando que as estruturas primárias das sPLA₂s de venenos de serpentes variam de acordo com as espécies e que a maioria delas ocorrem como isoformas em uma única espécie, um certo grau de variabilidade nos PLIs deve ser esperado. Esta variabilidade pode ser fundamental para garantir a eficácia destas moléculas como inibidores de PLA₂ e ampliar seu espectro de ação. Já foi relatado que o inibidor CNF, da serpente *C. d. terrificus*, é capaz de neutralizar PLA₂ de *L. muta* e de *B. jararacussu* de modo até mesmo mais eficiente do que sua própria PLA₂ (Fortes-Dias, e cols., 1999). Estudos evolucionários têm demonstrado que *Lachesis* é muito próxima, filogeneticamente, de *Crotalus* (Campbel e Lamar, 2004), mas outros estudos no mesmo sentido, envolvendo

serpentes do gênero *Bothrops* são bastante escassos e não permitem nenhuma inferência neste sentido.

Mesmo com o esforço de vários grupos de pesquisa, as relações filogenéticas dentro da subfamília Crotalinae, particularmente, entre o gênero *Bothrops*, é ainda hoje controversa (Castoe e Parkinson, 2006; Graziotin e Echeverrigaray, 2005). Uma das principais dificuldades é a diversidade de espécies que formam este gênero. Além disto, o número e tipo de espécies empregadas nos diferentes estudos fazem com que estes sejam inconclusivos.

Seria muito interessante comparar as árvores filogenéticas geradas para os PLIs com as PLA₂ originárias do veneno das espécies correspondentes, mas uma busca por estas PLAs em banco de dados públicos resultou incompleto.

Mais de 100 sequências completas de sPLA₂s de venenos de serpentes foram depositadas em bancos de dados públicos internacionais até o momento, incluindo enzimas ativas dos grupos I e II, além de homólogos de sPLA₂ sem atividade ou com baixa atividade. Infelizmente, apenas quatro enzimas D49 de serpentes botrópicas foram encontradas nos venenos de: *B. erythromelas* ([DQ359993](#)), *B. jararaca* (Serrano e cols., 1999) e *B. jararacussu* ([P45881](#) e [Q90249](#)). A falta de dados sobre as moléculas de sPLA₂s que poderiam interagir com os PLIs estudados aqui, impediram uma comparação mais profunda entre os PLIs com suas svPLA₂s. Tentaremos no futuro incorporar dados adicionais em nossos estudos, quando houver maior disponibilidade de espécies.

Muitos estudos têm mostrado que as sPLA₂s das serpentes viperídeas evoluíram via evolução acelerada para obter atividades fisiológicas diversificadas (Kihara e cols., 1992; Ohno e cols., 1998). Deste então, vários autores têm proposto que os PLIs teriam sofrido coevolução de modo a serem capazes de inibir a ampla diversidade de enzimas svPLA₂. Nobuhisa e cols. (1997) estudaram genes de PLIs, mas até agora não foi possível nenhuma

conclusão a respeito da evolução destas proteínas. Estes estudos são importantes devido ao potencial uso dos PLIs na neutralização de toxinas svPLA₂s de serpentes relacionadas filogeneticamente. Nossos estudos também não permitiram a conclusão desta suposição, uma vez que estudos da estrutura gênica destes inibidores não foi realizada para qualquer serpente brasileira, até o momento.

A maioria dos inibidores endógenos de serpentes reportados atualmente na literatura compartilha características estruturais e funcionais comuns entre as diferentes espécies, respeitada a classe. Entretanto, vários pesquisadores têm demonstrado que os PLIs apresentam preferências distintas relativamente ao caráter ácido, básico ou são indiferentes para o tipo de enzima svPLA₂ que inibem. Hains e cols. (2001) mostraram que o inibidor NSI (classe gama) purificado do sangue da serpente *Notechis scutatus*, apresenta ampla especificidade para sPLA₂ e é capaz de inibir, inclusive, uma sPLA₂ humana implicada em doenças como osteoartrite e artrite reumatóide. Sendo assim, estudos de modificações pós-traducionais são importantes no sentido de que podem aumentar nossas perspectivas na elucidação das várias possibilidades de aplicação biotecnológica para estas proteínas.

Foi verificado que todas as seqüências de ambas as classes de inibidores apresentaram sítios potenciais para fosforilação. Esta descoberta reforça a sugestão de vários pesquisadores, os quais acreditam que estas moléculas fosforiladas estão implicadas em atividades muito mais complexas do que demonstrado até agora (Murakami e cols., 2000; Triggiani e cols., 2005; Okumura e cols., 2005). Outra característica importante é que a ligação entre sPLA₂s e os PLIs é independente do íon cálcio, bem como da glicosilação, ainda que radicais de carboidratos sejam um ponto comum em PLIs, conforme demonstrado por vários pesquisadores (Nobuhisa e cols., 1998; Soares e cols., 2003; Kogaki e col., 1989; Okumura e cols., 2005).

Embora seja crítico entender o mecanismo pelo qual as moléculas de PLIs exercem sua atividade inibitória sobre as sPLA₂s, atualmente não existe nenhuma molécula de PLI cristalizada, depositada em banco de dados públicos. Para entender a distinção entre os vários inibidores e o delineamento do modo de interação com as moléculas ligantes, seria interessante o conhecimento de suas estruturas tridimensionais. Como não existem estruturas homólogas para comparação, este entendimento se torna bastante prejudicado.

A Tabela 7 mostra a contribuição deste trabalho de prospecção para 50 novas proteínas similares aos inibidores de fosfolipase A₂ (PLIs) das classes alfa (38) e gama (12), encontradas em serpentes brasileiras da subfamília Crotalinae.

Tabela 7. PLIs endógenos purificados do plasma de serpentes venenosas e não venenosas

Classe	Espécie	Nome	MM ¹ (Da) e estrutura quaternária	Família/ Subfamília	Número de acesso ou referência
α (CRD-like)	<i>Agkistrodon b.siniticus</i> ²	PLIα	75.000, homotrímero	Viperidae, Crotalinae	AB026666 AB026667
	<i>Atropoides nummifer</i>	AnMIP	92.000, homotrímero	Viperidae, Crotalinae	DQ657241 DQ657242
	<i>Bothrops asper</i>	BaMIP	120.000, homopentâmero	Viperidae, Crotalinae	P81077
	<i>Bothrops alternatus</i> ³	aBalt_03	(18.515,90)	Viperidae, Crotalinae	EU421901
		aBalt_06			EU421902
		aBalt_08			EU421903
		aBalt_10			EU421904
		aBalt_14			EU421905
	<i>Bothrops erythromelas</i> ³	aBe_02	(18.484,99)	Viperidae, Crotalinae	EU421906
		aBe_04			EU421907
		aBe_08			EU421908
		aBe_10			EU421909
		aBe_12			EU421910
		aBe_14			EU421911
	<i>Bothrops jararaca</i> ³	aBja_02	(18.488,88)	Viperidae, Crotalinae	EU421912
		aBja_06			EU421913
		aBja_07			EU421914
		aBja_10			EU421915
	<i>Bothrops jararacussu</i> ³	aBju_01	(18.455,96)	Viperidae, Crotalinae	EU421916
		aBju_05			EU421917
		aBju_07			EU421918
aBju_11		EU421919			
aBm_03		(18.499,73)			Viperidae, Crotalinae
aBm_04	EU421921				
aBm_05	EU421922				
aBm_08	EU421923				

		aBm_10			EU421924
		aBm_12			EU421925
	<i>Bothrops moojeni</i> ³	BmMIP-II	(23.000-25.000), homopolímero	Viperidae, Crotalinae	AF54045
	<i>Bothrops neuwiedi</i> ³	aBn_A1	(18.512,85)	Viperidae, Crotalinae	EU421926
		aBn_06			EU421927
		aBn_08			EU421928
		aBn_11			EU421929
	<i>Cerrophidion goodmani</i>	CgMIP-II	180.000, homopolímero	Viperidae, Crotalinae	
	<i>Crotalus d. terrificus</i> ³	aCdt_A4	(18.513,24)	Viperidae, Crotalinae	EU421930
		aCdt_A5			EU421931
		aCdt_B1			EU421932
		aCdt_B4			EU421933
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	PLI α -LP ⁴	51.000, homotrímero	Colubridae, Colubrinae	AB030247
	<i>Lachesis muta</i> ³	aLm_02	(18.491,75)	Viperidae, Crotalinae	EU421934
		aLm_03			EU421935
		aLm_06			EU421936
		aLm_07			EU421937
		aLm_09			EU421938
	<i>Trimeresurus flavoviridis</i> ⁵	PLI-A,B	100.000, heterotetrâmero	Viperidae, Crotalinae	P21755
		(IV,V)	72.000, homo e heterotrímero		P21756
β	(Leucine-rich)				
	<i>Agkistrodon b. siniticus</i>	PLI β	160.000, homotrímero	Viperidae, Crotalinae	AB007198
	<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI β	150.000, heterotrímero	Colubridae, Colubrinae	AB060638
γ	(u-PAR-like)				
	<i>Agkistrodon b. siniticus</i> ²	PLI γ	100 kDa, heteropolímero	Viperidae, Crotalinae	AB018372
	<i>Bothrops alternatus</i> ³	Balt_A2	20.074,04	Viperidae, Crotalinae	EU155166
		Balt_B2	20.088,02		EU155167
	<i>Bothrops erythromelas</i> ³	Be_A2	20.531,55	Viperidae, Crotalinae	EU155168
		Be_G1	20.415,43		EU155169
	<i>Bothrops jararaca</i> ³	Bja_A4	19.936,00	Viperidae, Crotalinae	EU155170
		Bja_B1	20.049,15		EU155171
	<i>Bothrops jararacussu</i> ³	Bju_A11	20.098,11	Viperidae, Crotalinae	EU155173
		Bju_B11	20.060,01		EU155172
	<i>Bothrops moojeni</i> ³	Bm_C1	19.936,00	Viperidae, Crotalinae	EU155175

<i>Bothrops neuwiedi</i> ³	Bm_A4 Bn_D1 Bn_E1	20.047,13 20.516,58 20.635,69		Viperidae, Crotalinae	EU155174 EU155176 EU155177
<i>Lachesis muta muta</i>	LNF1 LNF2	20.025,19 20.073,06		Viperidae, Crotalinae	AY425347 AY425346
<i>Crotalus d. terrificus</i>	CNF, CICS	140.000-160.000, homopolímero		Viperidae, Crotalinae	U08289
<i>Cerrophidion goodmani</i>	CgMIP-I	110.000, homopolímero		Viperidae, Crotalinae	Lizano (2000)
<i>Elaphe quadrivirgata</i>	EqPLI γ	130.000, heteropolímero		Colubridae, Colubrinae	AB021425
<i>Laticauda semifasciata</i>	LsPLI γ	100.000, heterotrímero		Elapidae, Laticaudinae	Ohkura (1999)
<i>Naja naja kaouthia</i>	PLI	90.000, heterotrímero		Elapidae, Elapinae	Q7LZI1
<i>Notechis ater</i>	NAI	heteropolímero		Elapidae, Acanthophiinae	AAF23778
<i>Notechis ater serventyi</i>	NSI	heteropolímero		Elapidae	_____
<i>Notechis scutatus</i>	NSI	heteropolímero		Elapidae, Acanthophiinae	AJ249830
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	OSI	heteropolímero		Elapidae, Acanthophiinae	AAF23781
<i>Oxyuranus microlepdotus</i>	OMI	heteropolímero		Elapidae, Acanthophiinae	AAF21048
<i>Pseudonaja textilis</i>	PTI	heteropolímero		Elapidae, Acanthophiinae	AAF21050
<i>Python reticulatus</i>	PIP	140.000, homoexâmero		Pythonidae	AF232771
<i>Trimeresurus flavoviridis</i> ⁵	PLI-I, II	Heteropolímero ?		Viperidae, Crotalinae	D87548

Não determinado	<i>Vipera palestinae</i>	ANF	56.000, Heteropolímero ?	Viperidae, Viperinae	1VPL_A P04084
------------------------	--------------------------	-----	--------------------------	----------------------	------------------

1. Entre colchetes: massa molecular calculada a partir de uma subunidade, baseada na estrutura primária
2. Atualmente renomeada *Gloydus brevicaudus*
3. PLI clonado a partir do fígado; atividade funcional não testada
4. α PLI-homólogo, sem atividade inibitória sobre svPLA₂
5. Atualmente renomeada *Protobothrops flavoviridis*.
6. Em negrito, seqüências prospectadas neste trabalho.

8. CONCLUSÕES

1. Neste trabalho foi comprovada a presença de transcritos de inibidores de PLA₂ da classe alfa (α PLI) no fígado de 8 espécies de serpentes brasileiras dos gêneros *Bothrops* (*B. Alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*), além das espécies *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta*.
2. Foi comprovada também a presença de transcritos de inibidores de PLA₂ da classe gama (γ PLI) em 6 espécies de serpentes brasileiras do gênero *Bothrops* : *B. Alternatus*, *B. erythromelas*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*.
3. Foram geradas seqüências nucleotídicas completas destes inibidores para, pelo menos, 4 clones diferentes de inibidores alfa e dois clones diferentes para o inibidor gama para cada espécie de serpente, totalizando 50 novas seqüências de PLIs;
4. A partir do alinhamento de nucleotídeos foi detectada uma grande quantidade de mutações sinônimas ou não, nas seqüências dos vários inibidores. No entanto, a geração de árvores filogenéticas mostrou que tanto as seqüências de PLIs quanto as PLIs de serpentes brasileiras são muito próximas;
5. Análises de modificações pós-traducionais, mostraram potenciais de sítios de N-glicosilação e de fosforilação em diversas localizações nas seqüências;
7. As estruturas secundárias foram preditas para todas as seqüências e modelos 3D foram gerados para cada classe de inibidores.

9. PERSPECTIVAS

Como perspectivas serão realizados experimentos de purificação de α PLIs nativos a partir do plasma total de serpentes para estudos de comparação com as proteínas recombinantes, cujo sucesso na expressão já obtivemos. Além disso, serão tentados novos vetores para expressão em sistemas procariota e eucariota, a fim se obtermos melhorias no rendimento das expressões. Estes experimentos incluem a expressão de inibidores gama em células eucariotas, uma vez que já foram realizadas as expressões destes inibidores com a utilização de diferentes vetores em sistema procariota.

Finalmente, deverão ser realizados estudos de inibição de sPLA₂ *in vitro* e *in vivo*, com o uso de peptídeos sintetizados a partir de segmentos das seqüências obtidas para ambos os PLIs, os quais apresentam potencial para proteção intelectual.

10. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Azevedo-Marques, M.M.; Cupo, P.; Coimbra, T.M.; Hering, S.E.; Rossi, M.A.; Laure, C.J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. *Toxicon* v. 23, p. 631-636, 1985.

Bailey, T.L., Williams, N., Misleh, C., Li, W. W. MEME: discovering and analyzing DNA and protein sequence motifs. *Nucleic Acids Res.* v. 34, p. 369-73, 2006.

Balsinde, J.; Balboa, M.; Insel, P.; Dennis, E. Regulation and inhibition of phospholipase A2. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* v.39, p.173-189, 1999.

Bell, J.K. The molecular structure of the Toll-like receptor 3 ligand-binding domain. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 102, p. 10976-10980, 2005.

Bjarnason, J.B. e Fox, J.W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmacol. Ther.* v. 62, p. 325-327, 1994.

Blom, N., Gammeltoft, S., Brunak, S. Sequence- and structure-based prediction of eukaryotic protein phosphorylation sites. *J. Mol. Biol.* v. 294, p. 1351-1362, 1999.

Bon, C.; Jeng, T.W. Crotoxin: a possible mechanism of action. *Adv. Cytopharmacol.* v.3, p.231-235, 1979

Broadly, W.; Rosanne, D. Snake inhibitors of phospholipase A2 enzymes. *Biochim. Biophys. Acta.* v.1533, p.29-37, 2001.

Campbell, J.A., Lamar, W.W. Pitvipers, family Viperidae. In: J.A. (Campbell e W.W. Lamar Eds.) The venomous reptiles of the Western hemisphere. *Comstock Publishing Associates, London*, p. 240-456, 2004.

Castoe, T.A., Parkinson, C.L. Bayesian mixed models and the phylogeny of pitvipers (Viperidae: Serpentes). *Mol. Phylogenet. Evol.* v. 39, p. 91-110, 2006.

Celotti, F. e Durand, T. The metabolic effects of inhibitors of 5-lipoxygenase and cyclooxygenase 1 and 2 are an advancement in the efficacy and safety of anti-inflammatory therapy. *Prostaglandins & other Lipid Mediators* v. 71, p. 147-162, 2003.

Cerdas, L. e Lomonte, B. Estudio de la capacidad ofiofaga y la resistencia de la zopilota (*Clelia clelia*, Colubridae) de Costa Rica a los venenos de serpente. *Toxicon* v. 20, p. 936-939, 1982.

Cupillard, L.; Mulherkar, R.; Gomez, N.; Kadam, S.; Valentin, E.; Lazdunski, M.; Lambeau, G. Both group IB and group IIA secreted phospholipases A2 are natural ligands of the mouse 180-kDa M-type receptor. *J. Biol. Chem.* v. 274, p. 7043-7051, 1999.

De Lima, D.C.; Abreu, P.,; de Freitas, C.C.; Santos, D.O.; Borges, R.O.; Dos Santos, T.C.; Mendes, L.; Rodrigues, C.R.; Castro, H.C. Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* v. 2, p. 39-47, 2005.

De Silva, A.; Wijekoon, A.S.; Jayasena, L.; Abeysekera, C.K.; Bao, C.X.; Hutton, R.A.; Warrell, D.A. Haemostatic dysfunction and acute renal failure following envenoming by Merrem's hump-nosed viper (*Hypnale hypnale*) in Sri Lanka: first authenticated case. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.* v. 88, p. 209-212, 1994.

Dennis, A. D. e Florence, F. Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J. Mol. Evol.* v.31, p.228-238, 1990.

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

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

Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Nakashima, K.; Nobuhisa, I.; Chijiwa, T.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Niwa, M.; Yamashina, I.; Hattori, S.; Ohno, M. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. *FEBS Lett.* v. 397, p. 83-88, 1996.

Drickamer, K.; Dordal, M.S.; Reynolds, L. Mannose-binding proteins isolated from rat liver contain carbohydrate-recognition domains linked to collagenous tails. Complete primary structures and homology with pulmonary surfactant apoprotein. *J. Biol. Chem.* v. 261, p. 6878-6887, 1986.

Dufton, M.J. e Hider, R.C. Classification of phospholipases A2 according to sequence. Evolutionary and pharmacological implications. *Eur. J. Biochem.* v. 137, p. 545-554, 1983.

Estêvão-Costa, M.I.; Diniz, C.R.; Magalhães, A.; Markland, F.S.; Sanchez, E.F. Action of metalloproteinases mutalysin I and II on several components of the hemostatic and fibrinolytic systems. *Thromb. Res.* v. 99, p. 363-376, 2000.

Farooqui, A.A. e Horrocks, L.A. Brain Phospholipase A2: A perspective on the history. *Prostaglandins, Leucotrienes and Essential Fatty Acids* v. 71, p. 161-169, 2004.

Felsenstein, J. Estimating effective population size from samples of sequences: a bootstrap Monte Carlo integration method. *Genet Res.* v. 60 (30), p. 209-220, 1992.

Fisher, A.B. e Chander, A. Lung surfactant--phospholipids and apoproteins. *Exp. Lung Res.* v. 6, p.171-174, 1984.

Fortes-Dias, C.L. Endogenous inhibitors of snake phospholipase A2 in the blood plasma of snakes. *Toxicon* v. 40, p. 481-481, 2002.

Fortes-Dias, C.L.; Barcellos, C.J.; Estevão-Costa, M.I. Molecular cloning of a inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). *Toxicon* v. 41, p. 909-917, 2003.

Fortes-Dias, C.L.; Jannotti, M.L.D.; Franco, F.J.L.; Magalhães, A.; Diniz, C.R. Studies on the specificity of CNF, a phospholipase A2 inhibitor isolated from the blood plasma of South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). I. Interaction with PLA2 from *Lachesis muta muta* snake venom. *Toxicon* v. 37, p. 1747-1759, 1999.

Fortes-Dias, C.L.; Lin, Y.; Ewell, J.; Diniz, C.R.; Liu, T. A phospholipase A₂ inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*): Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. *J. Biol. Chem.* v. 269, p. 15646-15651, 1994.

Fry, B.G.; Vidal, N.; Norman, J.A.; Vonk, F.J.; Scheib, H.; Ramjan, S.F.R.; Kuruppu, S.; Fung, K.; Hedges, S.B.; Richardson, M.K.; Hodgson, W.C.; Ignjatovic, V.; Summerhayes, R.; Kochva, E. Early evolution of venom system in lizards and snakes. *Nature* v. 04328, p. 1-5, 2005.

Fuentes, L.; Henández, M.; Nieto, M.; Crespo, M. Biological effects os group IIA secreted phospholipase A₂. *FEBS Letters* v. 531, p. 7-11, 2002.

Grazziotin, F., Echeverrigaray, S. Genetic relationships among species of the genus *Bothrops* based on RAPD markers. *Braz. Arch. Biol. Technol.* 48, 359-365, 2005.

Hains, P.G.; Broady, K.W. Purification and inhibitory profile of phospholipase A₂ inhibitors from Australian elapid sera. *Biochem. J.* v. 346, p. 139-146, 2000.

Hains, P.G.; Sung, K.L.; Tseng, A.; Broady, K.W. Functional characteristics of a phospholipase A₂ inhibitor from *Notechis ater* serum. *J. Biol. Chem.* v. 275, p. 983-991, 2000.

Hanasaki, K. Mammalian phospholipase A₂: phospholipase A₂ receptor. *Biol. Pharm. Bull.* v. 27, p. 1165-1167, 2004.

Higashino, K.; Ishizaki, J.; Kishino, J.; Ohara, O.; Arita, H. Structural comparison of phospholipase-A₂-binding regions in phospholipase A₂ receptors from various mammals. *Eur. J. Biochem.* v. 225, p. 375-382, 1994.

Higashino, K.; Yokoya, Y.; Ono, T.; Kamitani, S.; Arita, H.; Hanasaki, K. Identification of a soluble form phospholipase A₂ receptor as a circulating endogenous inhibitor for secretory phospholipase A₂. *J. Biol. Chem.* v. 277, p. 13583-13588, 2002.

Hseu, M.; Yen, C-Y; Tzen, M.C. Crobalbin: a new calcium-binding protein that is also a binding protein for crotoxin, a neurotoxic phospholipase A2. *FEBS Letters* v. 445, p. 440-444, 1999.

Huang, P. e Mackessy, S.P. Biochemical characterization of phospholipase A2 (trimorphin) from the venom of the Sonoran Lyre Snake *Trimorphodon biscutatus lambda* (family Colubridae). *Toxicon* v. 44, p. 27-36, 2004.

Huelsenbeck, J.P., Ronquist, F. MRBAYES: Bayesian inference of phylogenetic trees. *Bioinformatics* 17, 754-755, 2001.

Hulo, N.; Bairoch, A.; Bulliard, V.; Cerutti, L.; Cuče, B.; De Castro, E.; Lachaize, C.; Langendijk-Genevaux, P.S.; Sigrist, C.J.A. The 20 years of PROSITE. *Nucleic. Acids. Res.* 2007.

Hutton, R.A. e Warrell, D.A. Action of snake venom components on the haemostatic system. *Blood* v.7, p. 176-189, 1993.

Inoue, S.; Kogaki, H.; Ikeda, K.; Samejima, Y.; Omori-Satoh, T. Amino acid sequences of the two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis* – sequence homologies with pulmonary surfactant apoprotein and animal lectins. *J. Biol. Chem.*, v. 266, p. 1001-1007, 1991.

Inoue, S.; Shimada, A.; Ohkura, N.; Ikeda, K.; Samejima, Y.; Omori-Satoh, T.; Hayashi, K. Specificity of two types of phospholipase A2 inhibitors from the plasma of venomous snakes. *Biochem. Mol. Biol. Int.* v. 41, p. 529-537, 1997.

Kihara, H. Studies on phospholipase A2 in *Trimeresurus* venoms. III. Purification and some properties of phospholipase A2 inhibitor in Habu serum. *J. Biol. Biochem.* v. 80, p. 341-349, 1976.

Kihara, H.; Uchikawa, R.; Hattori, S.; Ohno, M. Myotoxicity and physiological effects of three *Trimeresurus flavoviridis* phospholipases A2. *Biochem. Int.* v. 28, p.895-903, 1992.

Kim, D.S.; Jang, Y.J.; Jeon, O.H.; Kim, D.S. Saxatilin, a snake venom disintegrin, suppresses TNF-alpha-induced ovarian cancer cell invasion. *J. Biochem. Mol. Biol.* v. 40, p. 290-294, 2007.

Kini, R.M e Iwanaga, S. Structure-function relationships of phospholipases. II: Charge density distribution and the myotoxicity of presynaptically neurotoxic phospholipases. *Toxicon* v. 24, p. 895-905, 1986.

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

Kini, R.M. e Evans, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A2. *Toxicon* v. 27, p. 613-635, 1989.

Kini, R.M. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. *Toxicon* v. 42, p. 827-840, 2003.

Kirkpatrick, L.L.; Matzuk, M.M.; Dodds, D.C.; Perin, M.S. Biochemical interactions of the neuronal pentraxins. Neuronal pentraxin (NP) receptor binds to taipoxin and taipoxin-associated calcium-binding protein 49 via NP1 and NP2. *J. Biol. Chem.* v. 275, p. 17786-17792, 2000.

Klein, J.D. e Walker, F.J. Purification of a protein C activator from the venom of the southern copperhead snake (*Agkistrodon contortrix contortrix*). *Biochemistry* v. 25, p. 4175-4179, 1986.

Kochva, E. The origin of snakes evolution of the venom apparatus. *Toxicon* v. 25, p. 65-106, 1987.

Kochva, E.; Nakar, O.; Ovidia, M. Venom toxins: plausible evolution from digestive enzymes. *Amer. Zool.* v. 23, p. 427-430, 1983.

Kogaki, H.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Samejima, Y.; Omori-Satoh, T.; Hamaguchi, K. Isolation and fundamental properties of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of *Trimeresurus flavoviridis*. *J. Biochem.* v. 106, p. 966-971, 1989.

Krizaj, I. e Gubensk, F. Neuronal receptors for phospholipases A (2) and beta-neurotoxicity. *Biochimie* v. 82, p. 807-814, 2000.

Kudo, I.; Murakami, M.; Hara, S.; Inoue, K. Mammalian non-pancreatic phospholipase A2. *Biochim. Biophys. Acta* v. 1170, p. 217-231, 1993.

Lambeau, G. e Lazdunski, M. Receptors for a growing family for secreted phospholipase A2. *TiPS*, v.20, p. 162-170, 1999.

Lambeau, G.; Schmid-Alliana, A.; Lazdunski, M; Barhanin, J. Identification and purification of a very high affinity binding protein for toxic phospholipase A2 in skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* v. 265, p. 9526-9532, 1990.

Lizano, S., Domont, G.B., Perales, J. Natural phospholipases A₂ inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon* v. 42, p. 963-977, 2003.

Lizano, S.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Fox, J.W.; Lambeau, G.; Lazdunski, M.; Gutiérrez. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion (Bothrops) godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. *Biochem. J.* v.346, p. 631-639, 2000.

Lizano, S.; Lomonte, B.; Fox, J.W.; Gutiérrez, J.M. Biochemical characterization and pharmacological properties of a myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Bothrops asper*. *Biochem. J.* v. 326, p. 853-859, 1997.

Lomonte, B.; Angulo, Y.; Calderón, L. An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action. *Toxicon* v. 42, p. 885-901, 2003.

Maraganore, J. M.; Merutka, G.; Cho, W.; Welches, W.; Kezdy, F. J.; Heinrikson, R. L. A new class of phospholipase A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. *J. Biol. Chem.* v. 259, p. 13839-13843, 1984.

Martins, M., Araújo, M.S., Sawaya, R.J., Nunes, R., 2001. Diversity and evolution of macrohabitat use, body size and morphology in a monophyletic group of Neotropical pitvipers (*Bothrops*). *J. Zool. Lond.* 254, 529-538.

Matilla, A. e Radrizzani, M. The Anp32 family of proteins containing leucine-rich repeats. *Cerebellum* v. 4, p. 7-18, 2005.

Melgarejo, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil. In: Cardoso, J.L.C.; França, F.O.S.; Wen, F.H.; Málaque, C.M.S.; Haddad-Júnior, V. Animais Peçonhentos do Brasil. 1 ed. São Paulo: Sarvier, 2003. Cap. 4, p. 33-44.

Ming-Jhy, H.; Chon-Ho, Y.; Mu-Chin, T. Crobalbin: a new calcium-binding protein that is also a binding protein for crotoxin, a neurotoxic phospholipase A₂. *FEBS Letters* v. 445, p. 440-444, 1999.

Miranda, M.E.; Couturier, G.A.; Canziani, G.A.; Seki, C; Vidal, J.C. Resistencia de *Crotalus durissus terrificus* y *Bothrops neuwiedi* a la neuroxicidad de cantidades masivas de veneno crotalico. *Acta Physiol. Latino-Americana* v. 32, p. 103-114, 1982.

Murakami, M. & Kudo, I. Diversity of phospholipase A₂ enzymes: Secretory phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull* v.27, p. 1158-1164, 2004.

Murakami, M. & Kudo, I. Diversity of phospholipase A₂ enzymes: Hot Topic in phospholipase A₂. *Biol. Pharm. Bull* v.27, p. 1179-1182, 2004.

Nakashima, K.; Ogawa, T.; Oda, N.; Hattori, M.; Sakaki, H.; Kihara, H.; Ohno, M. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A₂ isozymes. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v. 90, p. 5964-5968, 1993.

Nobuhisa, I.; Chiwata, T.; Fukumaki, Y.; Hattori, S.; Shimohigashi, Y.; Ohno, M. Structural elements of *Trimeresurus flavoviridis* serum inhibitors for recognition of its venom phospholipase a₂ isozymes. *FEBS Letters* v. 429, p. 385-389, 1998.

Nobuhisa, I.; Deshimaru, M.; Chiwata, T.; Nakashima, K.; Ogawa, T.; Shimohigashi, Y.; fukumaki, Y.; Sakaki, Y.; Hattori, S.; Kihara, H.; Ohno, M. Structures of genes encoding

phospholipase A2 inhibitors from the serum of *Trimeresurus flavoviridis* snake. *Gene* v. 191, p. 31-37, 1997.

Nobuhisa, I.; Inamasu, S.; Nakai, M.; Tatsui, A.; Mimori, T.; Ogawa, T.; Shimohigashi, Y.; fukumaki, Y.; Hattori, S.; Kihara, H.; Ohno. Characterization and evolution of a gene encoding a *Trimeresurus flavoviridis* serum protein that inhibits basic phospholipase A2 isozymes in the snake's venom. *Eur. J. Biochem.* v. 249, p. 838-845, 1997.

Nobuhisa, I.; Nakashima, K.; Deshimaru, M.; Ogawa, T.; Shimohigashi, Y.; fukumaki, Y.; Sakaki, Y.; Hattori, S.; Kihara, H.; Ohno, M. Accelerated evolution of *Trimeresurus okinavensis* venom gland phospholipase A2 isozyme-encoding genes. *Gene* v. 172, p. 267-272, 1996.

Ogawa, T.; Nakashima, K.; Nobuhisa, I.; Deshimaru, M.; Shimohigashi, Y.; Fukumaki, Y.; Sakaki, Y.; Hattori, S.; Ohno, M. Accelerated evolution of snake venom phospholipase A2 isozymes for acquisition of diverse physiological functions. *Toxicon* v. 34, p. 1229-1236, 1996.

Ohkura, N.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. The two subunits of a phospholipase A2 inhibitor from the plasma of Thailand cobra having structural similarity to urokinase-type plasminogen activator receptor and LY-6 related proteins. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 204, p. 1212-1218, 1994.

Ohkura, N.; Kitahara, Y.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. *J. Biochem.* v.125, p.375-382, 1999.

Ohkura, N.; Okuhara, H.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. Purification and characterization of three distinct types of phospholipase A2 inhibitors from the blood plasma of the Chinese mamushi, *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. *Biochem. J.* v. 325, p. 527-531, 1997.

Ohno, M. ; Ménez, R.; Ogawa, T. ; Danse, J. ; Shimohigashi, C. ; Fromen, C. ; Ducancel, F. ; Zinn-Justin, S. ; Le Du, M. ; Boulain, J. ; Tamiya, T. ; Ménez, A. Molecular evolution

of snake toxins: Is the functional diversity of snake toxins associated with a mechanism of accelerated evolution ? *Progr. Nucl. Acid. Res. Mol. Biol.* v. 59, p. 307-360, 1998.

Ohno, M.; Chijiwa, T.; Oda-Ueda, N.; Ogawa, T.; Hattori, S. Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. *Toxicon* v. 42, p. 841-854, 2003.

Okumura, K.; Ohno, A.; Nishida, M.; Hayashi, K.; Ikeda, K.; Inoue, S. Mapping the region of the α -type phospholipase a2 inhibitor responsible for its inhibitory activity. *J. Biol. Chem.* v.280, p. 37651-9, 2005.

Okumura, K.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. Identification and characterization of a serum protein homologous to alpha-type phospholipase A2 inhibitor (PLIalpha) from a nonvenomous snake, *Elaphe quadrivirgata*. *IUBMB Life* v. 55, p. 539-545, 2003.

Okumura, K.; Masui, K.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. Purification, characterization and cDNA cloning of a phospholipase A2 inhibitor from the serum of the non-venomous snake *Elaphe quadrivirgata*. *Biochem. J.* v.341, p. 165-171, 1999b.

Okumura, K.; Ohkura, N.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. A novel phospholipase A2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus* – Sequence homologies with human leucine rich α_2 -glycoprotein. *J. Biol. Chem.* v. 273, p.19469-19475, 1998.

Omori-Satoh, T.; Sadahiro, S.; Ohsaka, A.; Murata, R. Purification and characterization of an antihemorrhagic factor in the serum of *Trimeresurus flavoviridis*, a crotalid. *B.B. Acta* v. 285, p. 414-426, 1972.

Palma, M. S.; Yamane, Y.; Camargo, A. C. Biodiversidade: preservação e bioprospecção. (<http://www.comciencia.br/reportagens/biodiversidade/bio13.htm>).

Park, D.; Kim, J.; Kim, S.; Sonn, J.; Bang, O.; Kang, S.; Kim, J.; Baek, S. Akt as a mediator of secretory phospholipase A2 receptor-involved inducible nitric oxide synthase expression. *J. Immunology* v. 170, p. 2093-2099, 2003.

- Perales, J., Villela, C., Domont, G. B., Choumet, V., Saliou, B., Moussatché, H., Bon, C., Faure, G., 1995. Molecular structure and mechanism of action of the crotoxin inhibitor from *Crotalus durissus terrificus* serum. *Eur. J. Biochem.* 227, 19-26.
- Quirós, S.; Alape-Girón, A.; Angulo, Y.; Lomonte, B. Isolation, characterization and molecular cloning of AnMIP, a new alpha-type phospholipase A2 myotoxin inhibitor from the plasma of the snake *Atropoides nummifer* (Viperidae: Crotalinae). *Comp. Biochem. Physiol.* v.146, p. 60-68, 2007.
- Radvany, F.; Saliou, B.; Lembezat, M.P.; Bon, C. Binding of crotoxin, a presynaptic PLA2 neurotoxin, to negatively charged phospholipid vesicles. *J. Neurochem.* v. 53, p. 1252-1260, 1989.
- Ramoner, R.; Putz, T.; Gander, H.; Rahm, A.; Bartsch, G.; Schaber, C.; Thurnher, M. Dendritic-cell activation by secretory phospholipase A2. *Blood (Immunobiology)* v. 105, p. 3583-3587, 2005.
- Reid, R. C. Inhibitors of secretory phospholipase A2 group IIA. *Curr. Medic. Chem.* v. 12, p.3011-3026, 2005.
- Rouault, M.; Bollinger, J.G.; Lazdunski, M.; Gelb, M.H.; Lambeau, G. Novel mammalian group XII secreted phospholipase A2 lacking enzymatic activity. *Biochemistry* v. 42, p. 11494-11503, 2003.
- Rubsamen, K.; Breithaupt, H.; Habermann, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. I. subfractionation and recombination of the crotoxin complex. *Naunyn. Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* v. 270, p. 274-288, 1971.
- Sanger, F., Nicklen, S., Coulson, A.R. DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* v. 74, p. 5463-5467, 1977.
- Santos, R.M.; Oliveira, L.C.; Estevão-Costa, M.I.; de Lima, M.E.; Santoro, M.M.; Fortes-Dias, C.L. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from

Crotalus durissus terrificus (the South American rattlesnake). *Biochim. Biophys. Acta* v. 1717, p. 27-33, 2005.

Satou, N. & Nei, M. The neighbor-joining method: a new method for reconstructing phylogenetics trees. *Mol. Biol. Evol.*, v. 4, p. 406-425, 1987.

Schaloski, R.H. e Dennis, E.A. The phospholipase A₂ superfamily and its group numbering system. *Biochim. Biophys. Acta*. v. 1761, p. 1246-1259, 2006.

Serrano, S.M., Reichl, A.P., Mentele, R., Auerswald, E.A., Santoro, M.L., Sampaio, C.A., Camargo, A.C., Assakura, M.T., A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch. Biochem. Biophys.* 367, 26-32, 1999.

Shimada, A.; Ohkura, N.; Hayashi, K.; Samejima, Y.; Omori-Satoh, T.; Inoue, S.; Ikeda, K. Subunit structure and inhibition specificity of alpha-type phospholipase A(2) inhibitor from *Protobothrops flavoviridis*. *Toxicon* 2007 Dec 23; [Epub ahead of print]

SINAN/SVS, Ministério da Saúde (<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/novo/>). Acesso em novembro de 2007.

Soares, A.M.; Marcussi, S.; Stábeli, R.G.; França, S.C.; Giglio, J.R.; Ward, R.J.; Arantes, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A₂ myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochem. Biophys. Researh. Comm.* v. 302, p. 193-2000, 2003.

Soerensen, B. Acidentes por Animais Peçonhentos: Reconhecimento, Clínica e Tratamento. São Paulo: Atheneu, 2000.

Sosa, B.P.; Alagon, A.; Martin, B.M.; Possani, L.D. Biochemical characterization of the phospholipase A₂ purified from the venom of the mexican beaded lizard (*Heloderma horridum hirridum* Wiegmann). *Biochemistry* v. 25, p. 2927-2933, 1986.

Teixeira, C.; Landucci, E.; Antunes, E.; Chacur, M.; Cury, Y.; Inflammatory effects of snake venom myotoxic phospholipase A₂. *Toxicon* v. 42, p. 947-962, 2003.

Thompson, J.D., Higgins, D.G., Gibson, T. J. Clustal W: improving the sensitivity of progressive multiple sequence alignment through sequence weighting, position-specific gap penalties and weight matrix choice. *Nucleic Acids Research* v. 22, p. 4673- 4680, 1994.

Thwin, M.; Golapakrishnakone, P.; Kini, R.M.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake *Python reticulatus*: phospholipase A₂ inhibition and venom neutralizing potential. *Biochemistry* v. 39, p. 9604-9611, 2000.

Thwin, M.; Ong, W.; Fong, C.; Sato, K.; Kodama, K. Farooqui, A; Gopalakrishnakone, P. Secretory phospholipase A₂ activity in the normal and kainite injected rat brain, and inhibition by a peptide derived from python serum. *Exp. Brain Res.* v. 150, p. 427-433, 2003.

Thwin, M.; Satish, R.L.; Chan, S.T.F.; Golapakrishnakone, P. Functional site of endogenous phospholipase A₂ inhibitor from *Python* serum. *Eur. J. Biochem.* v. 269, p. 719-727, 2002.

Tischfield, A.J. A reassessment of the low molecular weight phospholipase A₂ gene family in mammals. *J. Biol. Chem.* v. 272, p. 17247-17250, 1997.

Tomihara, Y.; Yonaha, K.; Nozaki, M.; Yamakawa, M.; Kawamura, Y.; Kamura, T.; Toyama, S. Purification of an antihemorrhagic factor from the serum of the non-venomous snake *Dinodon semicarinatus*. *Toxicon* v. 26, p. 420-423, 1988.

Tõnismägi, K.; Samel, M.; Trummal, K.; Rönholm, G.; Siigur, J.; Kalkkinen, N.; Siigur, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Toxicon* v. 48, p. 227-237, 2006.

Triggiani, M.; Granata, F.; Giannattasio, G.; Marone, G. Secretory phospholipases A₂ in inflammatory and allergic diseases: Not just enzymes. *J. Allergy Clin. Immunol.* v.5, p. 1000-1006, 2005.

Valdujo, P.H.; Nogueira, C.; Martins, M. Ecology of *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Serpentes: Viperidae: Crotalinae) in the Brazilian Cerrado. *Journal of Herpetology* v. 36, p. 169-176, 2002.

Valentin, E. e Lambeau, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂? *Biochimie* v.82, p.815-831, 2000a.

Valentin, E; Ghomashchi, F.; Gelb, M.; Lazdunski, M.; Lambeau, G. Novel human secreted phospholipase A(2) with homology to the group III bee venom enzyme. *J. Biol. Chem.* v. 275, p. 7492-7496, 2000b.

Vandermeers, A; Vandermeers-Piret, M.C.; Vigneron, L.; Rathe, J.; Stievenart, M.; Christophe, J. Differences in primary structure among five phospholipase A₂ from *Heloderma suspectum*. *Eur. J. Biochem.* v. 196, p. 537-544, 1991.

Vellard, J. Resistencia de los “*Didelphys*” (zarigueya) a los venenos ofídicos (Nota prévia). *Rev. Brasil. Biol.* v. 5, p. 463-467, 1945.

Vital-Brazil, O. Pharmacology of crystalline crotoxin. II Neuromuscular blocking action. *Mem. Inst. Butantan* v. 33, p. 981-992, 1966.

Vucemilo, N.; Copic, A.; Gubensk, F.; Krizaj, I. Identification of a new high-affinity binding protein for neurotoxic phospholipase A₂. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* v. 251, p. 209-212, 1998.

Ward, R.J.; Chioato, L.; Oliveira, A.H.C.; Ruller, R.; Sá, J.M. Active-site mutagenesis of a Lys 49-phospholipase A₂: biological and membrane-disrupting activities in the absence of catalysis. *Biochem. J.* v. 362, p. 89-96, 2002.

Weis, W.I. & Drickamer, K. Trimeric structure of a C-type mannose-binding protein. *Structure* v. 2, p. 1227-40, 1994.

Wüster, W., Salomão, M., Quijada-Mascareñas, J., Thorpe, R. Origins and evolution of the South American pitviper fauna: evidence from mitochondrial DNA sequence analysis. In:

G.W. Schuett, M. Hoggren, M.E. Douglas and H.W. (Eds.), *Biology of the Vipers*. Eagle Mountain Publishing, p. 111-128, 2002.

Yedgar, S.; Lichtenberg, D.; Schnitzer, E. Inhibition of phospholipase A2 as a therapeutic target. *Biochem. Biophys. Acta* v. 1488, p. 182-187, 2000.

Zhao, K.; Zhou, Y.; Lin, Z. Structure of a basic phospholipase A2 from *Agkistrodon halys* Pallas: implications for its association, hemolytic and anticoagulant activities. *Toxicon* v. 38, p. 901-916, 1999.

Zuliani, J.P.; Fernandes, M.C.; Zamuner, S.R.; Gutiérrez, J.M.; Teixeira, C.F.P. Inflammatory events induced by Lys-49 and Asp-49 phospholipases A2 isolated from *Bothrops asper* snake venom: role of catalytic activity. *Toxicon* v. 45, p. 335-346, 2005.

11. Produções bibliográficas no período de tese

12.1. Artigos

Prospection, structural analysis and phylogenetic relationships of endogenous g-phospholipase A2 inhibitors in Brazilian Bothrops snakes (Viperidae, Crotalinae). Estevão-Costa, M. I.; Rocha, B. C.; Mudado, M. A.; Redondo, R.; Franco, G. R.; Fortes-Dias, C. L. *Toxicon*. v. 52, p. 122-129, 2008.

de Assis EB, Estevão-Costa MI, do Carmo Valentim A, Silva-Neto A, Agostini Cotta G, Alvarenga Mudado M, Richardson M, Fortes-Dias CL. Purification and Complete Primary Structure of the First PLA(2) from *Lachesis stenophrys* (the Central American Bushmaster) Snake Venom. *Protein J*. v. 27(5):327-33, 2008.

Santos RM, Oliveira LC, Estevão-Costa MI, de Lima ME, Santoro MM, Fortes-Dias CL. Inhibition of crotoxin binding to synaptosomes by a receptor-like protein from *Crotalus durissus terrificus* (the South American rattlesnake). *Biochim Biophys Acta* v. 1717, p. 27-33, 2005.

Fortes-Dias CL, Barcellos CJ, Estevão-Costa MI. Molecular cloning of a gamma-phospholipase A2 inhibitor from *Lachesis muta muta* (the bushmaster snake). *Toxicon* v.417, p. 909-17, 2003.

12.2. Capítulo de livro

FORTES-DIAS, C. L. ; ESTEVÃO-COSTA, M. I. . Snakes as source of phospholipase A2 inhibitors with biotechnological potential. In: De Lima,M.E.; Pimenta, A.C.M.; Martin-Eauclaire, M.F.; Zingali, R.B.; Rochat, H.. (Org.). Animal Toxins: state of the art. Perspectives in Health and Biotechnology. Belo Horizonte: Editora UFMG, 2009, v. , p. 607-620.