



FUNDAÇÃO UNIVERSIDADE DE BRASÍLIA  
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal



**ANÁLISE DA PEÇONHA DE *Bothropoides marmoratus*, COM ÊNFASE NA  
CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E/OU ANTITUMORAL**

Jéssica Kele Arruda Macêdo

Orientadora: Profa. Dra. Mariana S. Castro

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal da Universidade de Brasília como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre.

Brasília  
2011

Universidade de Brasília  
Instituto de Ciências Biológicas  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Animal

Dissertação de mestrado  
JÉSSICA KELE ARRUDA MACÊDO

Título:  
**ANÁLISE DA PEÇONHA DE *Bothropoides marmoratus*, COM ÊNFASE NA  
CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ATIVIDADE  
ANTIMICROBIANA E/OU ANTITUMORAL**

Comissão Examinadora:

Profª. Dra. Mariana S. Castro  
Orientadora - UnB

Profª. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila  
Membro Titular - UFU

Prof. Dr. Carlos André Ornelas Ricart  
Membro Titular - UnB

Prof. Dr. Carlos Alberto Schwartz  
Membro Suplente - UnB

*“A ciência humana de maneira nenhuma nega a existência de Deus. Quando considero quantas e quão maravilhosas coisas o homem compreende, pesquisa e consegue realizar, então reconheço claramente que o espírito humano é obra de Deus, e a mais notável.”*

*(Galileu Galilei)*

*“É o espírito que conduz o mundo e não a inteligência”.*

*(Saint Exupéry, em O Pequeno Príncipe)*

## *Dedicatória*

*Dedico essa dissertação de mestrado...*

*Primeiramente a Deus, pela saúde, pelas oportunidades e por nunca me deixar só.*

*Aos meus pais Marcos e Tereza por todo amor, confiança e apoio incondicional. A força e os ensinamentos de vocês me permitiram seguir em frente. Vocês são para mim modelo de determinação, honestidade e caráter e são as pessoas mais fortes e especiais do mundo!*

*Às minhas irmãs pelo carinho, companheirismo e incentivo, especialmente à Stéfane por ter gastado tanto do seu tempo fazendo favores e me ajudando e ao meu sobrinho, um presente de Deus, por trazer paz e alegria a nossa família. Obrigada pelas agradabilíssimas interrupções.*

*À minha família brasiliense João, Ana, Luciana, Lucas e Ester. Eu não tenho nem palavras para agradecer.... Sem vocês não haveria nada! Não haveria tranquilidade, alegria e nem dissertação! Vocês me mostraram um amor tão grande, que nunca imaginei sentir.*

*Ganhei na loteria com vocês!*

*Ganhei um pai e uma mãe de valor inestimável!*

*Um irmão precioso, que eu sempre desejei ter.*

*Uma irmã de ouro! → obrigada pelos risos e lágrimas, Lu.*

*Uma sobrinha linda e adorável.*

*Ao Sayro, por ter ficado ao meu lado, por estar comigo nos melhores momentos, e por ter aguentado os piores. Por ter acreditado em mim quando nem eu mesma acreditava e por ter me incentivado e me dado força como ninguém! Não conheço palavras que expressem a emoção, gratidão e amor que sinto.*

*“Ainda que eu falasse a língua dos homens e dos anjos,  
ainda que eu tivesse o dom de profecia,  
e conhecesse todos os mistérios e toda a ciência,  
ainda que eu tivesse toda a fé,  
e entregasse o meu corpo a ser queimado...*

*Se eu não tivesse amor eu nada seria, e nada disso me aproveitaria.*

*O amor é sofredor, é benigno, não é invejoso, não trata com imprudência, não se ensorbece, não ofusca os seus interesses, não se irrita, não suspeita mal...*

*Tudo crê, tudo espera, tudo suporta.*

*Permaneçamos em fé, esperança e amor,  
dentre estes, o maior é o amor”*

*(1 Coríntios Cap. 13)*

## **Agradecimentos**

São muitas as pessoas que devo agradecer.

“Quem caminha acompanhado, certamente vai mais longe”.

À Profa. Dra. Mariana de Souza Castro pelos ensinamentos, pela confiança e por ter aceitado o desafio. Um exemplo de orientadora (tranquila, motivadora e confiante), mulher (determinada e trabalhadora), esposa e mãe (apaixonada, dedicada e divertida). A ela, todo meu respeito e admiração. Muito obrigada!

Ao Prof. Dr. Osmino Rodrigues Pires Jr. pelos inúmeros ensinamentos, por estar sempre presente e ter se tornado um amigo no qual eu pude confiar. “Valeu!!”

À prof. Msc. Marta Regina Magalhães do CEPB – PUC Goiás pela classificação das serpentes, fornecimento da peçonha, e principalmente pela amizade e por ter me mostrado o caminho e aberto algumas portas.

Aos professores do Laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas, Dr. Wagner Fontes, Dr. Carlos André O. Ricart, Dra. Consuelo Medeiros, MSc. Pedro Zanotta e Dr. Sebastián Charneau e Dr. Marcelo V. de Sousa pela disponibilização de materiais, equipamentos e pelas sugestões.

Ao Dr. Ricardo Bentes Azevedo pelos ensinamentos durante o mestrado e apoio.

À amiga MSc. Graziella Joannite, pela inestimável ajuda com os ensaios citotóxicos e por ter me ensinado a enxergar sempre a pequena luz no fim do túnel.

Ao MSc. Mário Sérgio Rocha da UFU pelo auxílio com a atividade proteolítica.

Ao Dr. Luciano Paulino Silva pela disposição e inestimáveis ensinamentos durante os primeiros passos no mestrado.

Ao Nuno Domingues, Antônio Rufino, Daniel e Washington pelo apoio técnico e disposição em ajudar.

Aos queridos amigos do laboratório de Bioquímica e Química de Proteínas Gabriel e Rafael, os primeiros que conheci e que são um exemplo para mim. À Diana, Elaine, Anne, Adriana, Aline e Michaela, que me proporcionaram as melhores risadas, e me doaram seus ouvidos...Como seria chato sem a tradicional reunião das meninas! E temos que dar continuação à história do rompimento do cavalo e do porco na selva...

Aos meninos pelas divertidas interrupções, Rayner, Adelson, César, Jaques, Alan Pedro e Humberto, agora que passou posso dizer que vocês são uns chatos muito legais! Especialmente ao Rayner pela companhia diária e por estar sempre disposto a ajudar. Vocês tornaram cada dia especial...muito especial!!

Aos amigos e professores do laboratório de Toxinologia e Anatomia Dr. Carlos Alberto Schwartz, Jimmy, Fagner, Rafael, Christiano Gati, Pedro Ivo, Leandro, Natiela, Fernandinha (comédia), Talita, Janaína, Carol e Luísa pela companhia, por todos os momentos divertidos que tivemos. Cada um de vocês é especial para mim.

Às “amigas da vez”. Kelliane, a primeiríssima que me ajudou muito, e me apoiou enquanto não conhecia mais ninguém, me fazendo acreditar que existiam pessoas maravilhosas por aqui. Pollyanna, sempre disposta a ajudar e, mesmo os horários não se batendo muito, esteve comigo a maior parte do tempo! Amo você, menina! Vou sentir muita saudade! Solange, pelos conselhos e pelas milhares de gargalhadas, também vou sentir muitíssimo a sua falta. Rosa, por ter confiado em mim, por ser tão doce e me oferecer sua atenção quando tanto precisei. Andréa, minha “brother”, por ter chorado junto comigo e por ter me feito rir como ninguém no meu momento de desespero e loucura total, por ter me feito acreditar que ia dar certo, por ter me incentivado a seguir em frente e principalmente por ter me ensinado que nenhum obstáculo é grande demais. O meu agradecimento muito especial a vocês cinco.

À família goiana, meus pais, irmãs e meu sobrinho pelo amor e suporte incondicional.

À minha família brasiliense, João e Ana, Luciana, Fernando, e Esterzinha, Lucas e Alessandra por terem me adotado, pelas importantes lições e, sobretudo pela confiança, compreensão e magnífico apoio. Também ao Chico, América, Anderson, Zaninha, Alessandro, Patrícia, Iandra, Júnior e Léo pelo carinho e pelos momentos maravilhosos.

Ao Sayro pela confiança e pelo amor, sem os quais eu não teria conseguido.

Às amigas que mesmo distantes me apoiaram e me confortaram: Lília, Patrícia, Tamyris, Rôsy e Ana Carla. Eu sempre soube que podia contar com vocês e que eu nunca estaria sozinha, meninas. Obrigada mesmo!

Às novas e especiais amizades adquiridas em Brasília pelo carinho e diversão que me ajudaram a suportar a saudade de casa. Débora, Janaína e Helena.

A todos que de forma direta e indireta colaboraram para a realização e conclusão deste trabalho, minha eterna e sincera gratidão e reconhecimento.

# SUMÁRIO

<b>LISTA DE ABREVIATURAS .....</b>	<b>VIII</b>
<b>LISTA DE FIGURAS .....</b>	<b>X</b>
<b>LISTA DE TABELAS .....</b>	<b>XI</b>
<b>RESUMO.....</b>	<b>XII</b>
<b>ABSTRACT.....</b>	<b>XIII</b>
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
Fosfolipases	04
Proteases	08
Lectinas	12
Potencial biotecnológico	13
Potencial antimicrobiano	14
Potencial antitumoral	16
A espécie <i>Bothropoides marmoratus</i>	21
<b>2. OBJETIVOS .....</b>	<b>26</b>
<b>3. MATERIAIS E MÉTODOS .....</b>	<b>28</b>
3.1 Reagentes e soluções	29
3.2 Peçonha	29
<b>Primeira etapa – Purificação e <i>screening</i> de atividade biológica</b>	
3.3. Fracionamento da peçonha bruta	29
3.4. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana	30
3.5. Avaliação da atividade citotóxica	31
3.6. Avaliação da morfologia celular	32
3.7 Avaliação da atividade hemolítica	33
3.8. Análise por espectrometria de massa	33
<b>Segunda etapa – Purificação e <i>screening</i> de atividade biológica</b>	
3.9 Purificação das frações de interesse	33
3.10 Redução e alquilação	34
3.11.Determinação da quantidade de cisteínas	34
3.12 Digestão trípica	35
3.13 Determinação das massa moleculares e análise por PMF	35
3.14.Determinação quantitativa de proteínas	36
3.15.Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)	36
3.16.Ensaio Antitumoral	36
3.17.Avaliação da morfologia celular	37
3.18.Determinação da HC <sub>50</sub>	37
3.19.Avaliação da atividade fosfolipásica	37
3.20.Avaliação da atividade proteolítica sobre fibrinogênio	38

<b>4. RESULTADOS.....</b>	<b>39</b>
<b>Primeira etapa – Purificação e <i>screening</i> de atividade biológica</b>	
4.1 Fracionamento da peçonha bruta (RP-HPLC)	40
4.2. Análise por espectrometria de massa	41
4.3. Ensaio antimicrobiano e citotóxico da peçonha bruta de <i>B. marmoratus</i>	
4.3.1. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana	41
4.3.2. Avaliação preliminar da atividade citotóxica	43
4.3.3. Avaliação da morfologia celular	44
4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações	44
4.5. Avaliação da atividade citotóxica das frações	46
4.6. Avaliação da atividade hemolítica das frações	46
<b>Segunda etapa – Purificação e <i>screening</i> de atividade biológica</b>	
4.7. Purificação das frações de interesse (RP-HPLC)	48
4.8. Determinação da quantidade de resíduos de cisteína	54
4.9. "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF)	54
4.10. Efeitos citotóxicos das frações de interesse	58
4.11. Determinação da HC <sub>50</sub>	58
4.12. Avaliação da atividade fosfolipásica das frações	58
4.13. Avaliação da atividade proteolítica sobre fibrinogênio	59
<b>5. DISCUSSÃO.....</b>	<b>61</b>
5.1. Fracionamento da peçonha bruta e purificação das frações	62
5.2. Análise por espectrometria de massa	62
5.3. Peptide Mass Fingerprinting (PMF)	63
5.4. Determinação da quantidade de cisteínas	63
5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana	64
5.6. Avaliação da atividade citotóxica	66
5.7. Avaliação da morfologia celular	68
5.8. Avaliação da atividade fosfolipásica	69
5.9. Avaliação da atividade proteolítica sobre fibrinogênio	70
<b>6. CONCLUSÃO.....</b>	<b>71</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....</b>	<b>73</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS

<b>[M+H]<sup>+</sup></b>	Massa molecular monoisotópica.
<b>Abs</b>	Absorbância
<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>ATCC</b>	American Type Culture Collection
<b>BSA</b>	Albumina sérica bovina, do inglês "bovine serum albumin"
<b>CFUs</b>	Unidades formadoras de colônias, do inglês "colony-forming units"
<b>Da</b>	Dalton
<b>DHB</b>	Ácido 2,5-dihidroxibenzóico
<b>DMEM</b>	Dulbecco/Vogt modified Eagle's minimal essential medium.
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>EDTA</b>	Ácido etilenodiaminotetraacético
<b>HC<sub>50</sub></b>	Concentração capaz de promover 50% de hemólise
<b>HCCA</b>	Ácido $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico
<b>HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês "High Performance Liquid Chromatography"
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração capaz de inviabilizar 50% das células
<b>LTC</b>	Lectina do tipo C
<b>m/z</b>	Massa/carga
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix Assisted Laser Desorption Ionization–Time of Flight
<b>MIC</b>	Concentração inibitória mínima, do inglês, "minimum inhibitory concentration"
<b>MM</b>	Massa molecular
<b>MS</b>	Espectrometria de massa, do inglês "mass spectrometry"
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio
<b>PBS</b>	Tampão fosfato de sódio, do inglês "phosphate buffered saline"
<b>PDB</b>	Protein Data Bank
<b>PFF</b>	"Peptide fragment fingerprint"
<b>PLA<sub>2</sub></b>	Fosfolipase A <sub>2</sub>
<b>PMF</b>	"Peptide mass fingerprint"
<b>RP-HPLC</b>	Cromatografia líquida de alta eficiência em fase reversa, do inglês "Reversed-Phase High Performance Liquid Chromatography"

<b>rpm</b>	Rotações por minuto
<b>SA</b>	Ácido sinapínico, do inglês "Sinapinic acid"
<b>SVMP</b>	Metaloprotease da peçonha de serpentes, do inglês "Snake Venom Metallo-Protease"
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>TNF</b>	Fator de necrose tumoral.
<b>v</b>	Volume

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura</b>	<b>Página</b>
<b>Figura 1.</b> Hidrólise de fosfatidilcolina pela PLA <sub>1</sub> , PLA <sub>2</sub> , PLB, PLC e PLD e os respectivos produtos da reação .....	5
<b>Figura 2.</b> Classificação das PLA2 .....	7
<b>Figura 3.</b> Representação esquemática dos domínios das classes de SVMPS.....	11
<b>Figura 4.</b> Comparação estrutural entre uma lectina do tipo-C-símile e uma lectina tipo-C.....	12
<b>Figura 5.</b> (A) Mapa evidenciando a distribuição geográfica da espécie <i>B. marmoratus</i> e (B) sobreposição das distribuições geográficas das espécies do grupo <i>B. neuwiedi</i> .....	21
<b>Figura 6.</b> <i>Bothropoides marmoratus</i> .....	22
<b>Figura 7.</b> Perfil cromatográfico da peçonha bruta de <i>B. marmoratus</i> .....	40
<b>Figura 8.</b> Distribuição dos componentes de massas moleculares em relação à hidrofobicidade .....	41
<b>Figura 9.</b> Inibição da proliferação bacteriana causada pela peçonha bruta de <i>B. marmoratus</i> .....	42
<b>Figura 10.</b> Porcentagem de morte celular causada pela incubação das linhagens celulares com a peçonha bruta de <i>B. marmoratus</i> por 24h .....	43
<b>Figura 11.</b> Fotomicrografia das células submetidas ao tratamento com peçonha bruta de <i>B. marmoratus</i> .....	45
<b>Figura 12.</b> Porcentagem de morte celular das linhagens tumorais HeLa e MCF7 promovida pelas frações 16, 21, 23, 25 e 31.....	46
<b>Figura 13.</b> Purificação dos componentes presentes na fração 16 da peçonha de <i>B. marmoratus</i> e espectrogramas das subfrações .....	49
<b>Figura 14.</b> Purificação dos componentes presentes na fração 21 da peçonha de <i>B. marmoratus</i> e espectrogramas das subfrações .....	50
<b>Figura 15.</b> Purificação dos componentes presentes na fração 23 da peçonha de <i>B. marmoratus</i> e espectrograma da subfração 23.1 .....	51
<b>Figura 16.</b> Purificação dos componentes presentes na fração 25 da peçonha de <i>B. marmoratus</i> e espectrograma das subfrações .....	52
<b>Figura 17.</b> Purificação dos componentes presentes na fração 31 da peçonha de <i>B. marmoratus</i> e espectrograma da subfração 31.1 .....	53
<b>Figura 18.</b> Sequenciamento <i>de novo</i> dos peptídeos trípticos gerados pela digestão das subfrações 16.2, 23.2 e 31.7 .....	57
<b>Figura 19.</b> Determinação da atividade fosfolipásica de frações e subfrações da peçonha de <i>B. marmoratus</i> .....	59
<b>Figura 20.</b> Avaliação por SDS-PAGE da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio da subfração 31.7.....	60

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela</b>	<b>Página</b>
<b>Tabela 1.</b> Lista de toxinas publicadas das serpentes do grupo <i>neuwiedi</i> .....	<b>24</b>
<b>Tabela 2.</b> Comparação da atividade antimicrobiana, citotóxica e hemolítica de todas as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta de <i>B. marmoratus</i> por RP-HPLC.....	<b>47</b>
<b>Tabela 3.</b> Massa molecular monoisotópica e número de resíduos de cisteína das toxinas purificadas a partir da peçonha da serpente <i>B. marmoratus</i> .....	<b>54</b>
<b>Tabela 4.</b> Identificação de proteínas da peçonha de <i>B. marmoratus</i> por "Peptide Mass Fingerprinting".....	<b>55</b>
<b>Tabela 5.</b> Porcentagem de morte celular causada pelo tratamento de células HeLa com as frações brutas e subfrações purificadas da peçonha de <i>B.marmoratus</i> por 24h.....	<b>58</b>

# ANÁLISE DA PEÇONHA DE *Bothropoides marmoratus*, COM ÊNFASE NA CARACTERIZAÇÃO DE PROTEÍNAS COM ATIVIDADE ANTIMICROBIANA E/OU ANTITUMORAL

## RESUMO

Aproximadamente 90% dos constituintes da peçonha botrópica e botropóica são protéicos, tratando-se de uma mistura com enorme variedade de substâncias farmacologicamente ativas que atuam na indução de alterações fisiopatológicas. Pesquisas demonstram uma grande diversidade funcional e estrutural de componentes isolados da peçonha de serpentes capazes de fornecer informações biológicas, com várias aplicações biotecnológicas como, por exemplo, antimicrobianos e antitumorais. O presente trabalho descreve a purificação, identificação e caracterização bioquímica e biológica de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral provenientes da peçonha de *Bothropoides marmoratus*. A peçonha de *B. marmoratus* foi fracionada com o emprego de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa C<sub>18</sub>. Os ensaios para avaliação de atividade biológica foram realizados com a peçonha bruta e com todas as frações cromatográficas obtidas. A atividade citotóxica foi avaliada contra as linhagens celulares HeLa (câncer cervical), B16F10 (câncer de pele) e NHI3T3 (fibroblastos normais). Os ensaios para avaliação dos efeitos inibitórios sobre a proliferação de bactérias foram realizados com cinco linhagens de bactérias Gram-negativas e quatro Gram-positivas. As frações bioativas foram submetidas à recromatografia em sistema RP-HPLC para purificação dos componentes e, em seguida, analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. Os resultados indicam que a peçonha bruta de *B. marmoratus*, bem como algumas frações cromatográficas, apresentaram efeitos citotóxicos sobre as linhagens celulares e bactérias utilizadas. As análises por espectrometria de massa de quatro frações de interesse revelaram similaridade com uma fosfolipase A<sub>2</sub>, uma lectina do tipo-C, uma serinoprotease e com uma metaloprotease. Os resultados apontam para o potencial terapêutico da peçonha de *B. marmoratus* e evidencia a necessidade de estudos mais aprofundados acerca dos componentes moleculares presentes nessa peçonha. Alguns desses compostos apresentam potencial biotecnológico podendo vir a servir como modelos para o desenvolvimento de novas drogas.

**ANALYSIS OF *Bothropoides marmoratus* SNAKE VENOM, WITH EMPHASIS  
ON THE CHARACTERIZATION OF PROTEINS WITH ANTIMICROBIAL  
AND/OR ANTITUMORAL ACTIVITY**

**ABSTRACT**

Approximately 90% of the bothropic and bothropoic constituents of the venom are proteins, and it is a mixture with a variety of pharmacologically active substances that act to induce pathophysiological changes. Research shows a wide variety of functional and structural components isolated from the venom of snakes capable of providing biological information, with various biotechnological applications, for example, antimicrobial and antitumoral. This work describes the purification, identification and biochemical and biological characterization of proteins with antimicrobial and/or antitumoral activity from the *Bothropoides marmoratus* venom. Fractionation was performed by HPLC using a C18 reverse phase. The biological activities were carried out with crude venom and with all the chromatographic fractions obtained. The antitumor activity was tested by MTT method against the HeLa (cervical cancer), B16F10 (skin cancer) and against normal lineage NHI3T3 (fibroblasts). The antimicrobial activity assays were performed with five strains of gram-negative and four Gram-positive and all fractions of interest were subjected to a second chromatography for separation of the components present and then were analyzed by mass spectrometry MALDI TOF-TOF. The results show that the crude venom and some fractions caused the death of the cell lines tested and also the bacteria. Analysis by mass spectrometry revealed that the four fractions of interest have a similarity to phospholipase A2, a C-type lectin, a serineprotease and a metalloprotease. The results indicate the therapeutic potential of venom from *B. marmoratus* and shows the need to better study its components separately. Some components may be unsuitable for immediate use, but have great biotechnological potential serving as models for the development of new drugs.

# **1. INTRODUÇÃO**

## 1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os acidentes ofídicos causam a morte e lesão considerável em todo o mundo, especialmente em países tropicais e subtropicais e representam uma ameaça à saúde pública sendo, contudo, bastante negligenciados. Estudos abrangentes estimam que pelo menos 421.000 envenenamentos e 20.000 mortes por acidentes ofídicos ocorrem a cada ano em todo o mundo (Kasturiratne *et al.* 2008).

No Brasil, todos os esforços voltados para práticas de atendimento e disponibilização de tratamento específico garantiram o estabelecimento de ações capazes de minimizar a gravidade dos acidentes e, em especial, a ampliação da capacidade de produção de soro, que passou a ser suficiente para suprir as necessidades do país. Registros do Ministério da Saúde (2009) contabilizaram um total de 22.763 acidentes ofídicos em 2009 e 106 óbitos, mas a baixa valorização dada à informação por parte das instituições e profissionais de saúde têm levado a uma subnotificação dos acidentes registrados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN), o que pode gerar estimativas subestimadas.

Apesar da grande variedade de espécies de serpentes, nem todas são consideradas de interesse médico, pois não provocam envenenamentos graves em humanos, animais domésticos ou de interesse econômico. No Brasil, das 371 espécies descritas apenas 55, pertencentes às famílias Elapidae e Viperidae são consideradas de importância médica (Bérnils 2009).

No continente americano, os elapídeos são também conhecidos como corais verdadeiras, e fazem parte dessa família espécies dos gêneros *Leptomicrurus* Schimidt (América do Sul) e *Micrurus* Wagler (Américas do norte, Central e do Sul). Sua peçonha apresenta basicamente componentes neurotóxicos de ação pós e pré-sináptica e polipeptídios cardio-citotóxicos. Dados clínicos sobre a sintomatologia do envenenamento são escassos pela própria raridade dos acidentes, devido ao hábito semi-fossorial desses animais. Os sintomas são principalmente neurotóxicos, como paralisia flácida, levando à ptose palpebral, oftalmoplegia, paralisia das mandíbulas, músculos da laringe e faringe, sialorréia (intensa secreção salivar) e paralisia do pescoço e de outros membros. Nos casos mais severos, pode levar a óbito por parada respiratória. Além disso, exercem pequena atividade proteolítica (Vital-Brazil 1980, 1987, Bolaños 1984, Bucarechi 1990).

Os viperídeos são distribuídos nos gêneros *Caudisona*, *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Rhinocerophis* e *Lachesis* (Bérnils 2009) e suas peçonhas são consideradas presa-específicas, podendo variar em níveis de família, gênero, espécie e até mesmo indivíduos da mesma espécie podem apresentar mudanças significativas por influência de fatores como a idade, sexo, origem geográfica, sazonalidade, dieta e variabilidade genética (Chippaux *et al.* 1991).

As peçonhas de serpentes são conhecidas por apresentarem diversas ações biológicas: proteólise, coagulação, hemorragia, neurotoxicidade e miotoxidade (Ministério da Saúde 2001). Envenenamentos provocados por serpentes do gênero *Caudisona* popularmente conhecidas como cascavéis, provocam mal-estar, náuseas, cefaléia, prostração e sonolência. No local da picada ocorre edema discreto e parestesia (perda de sensibilidade), além dos sintomas envolvendo ações neurológicas e miotóxicas como fáceis miastênica, oftalmoplegia, dificuldade de acomodação visual, mioglobínúria e elevação dos níveis séricos de creatina-quinase, o que pode levar à morte por insuficiência renal (Azevedo-Marques *et al.* 2003). Os envenenamentos provocados pelos gêneros *Bothrops*, *Bothropoides*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias* causam edema, equimose, dor, hemorragia e mionecrose, associados a alterações sistêmicas como distúrbios cardiovasculares e hemodinâmicos, além das lesões renais.

Os acidentes provocados pelo gênero *Lachesis* apresentam manifestações semelhantes aos envenenamentos botrópicos, sendo os sintomas principais, lesões locais, que incluem edema e dor, hemorragia com sangramento digestivo e gengivorragia (Málaque & França 2003). Existem também algumas descrições de manifestações neurológicas, com ativação do sistema nervoso autônomo parassimpático, caracterizando-se por hipotensão arterial, sudorese, náuseas, vômitos, cólicas, diarreia e bradicardia (Haad 1981, Jorge *et al.* 1997).

Entre os gêneros acima, destacamos *Bothrops* e *Bothropoides*, uma vez que são responsáveis de cerca de 90% dos acidentes ofídicos notificados anualmente no Brasil (Ministério da Saúde 2001). Os animais pertencentes a esses gêneros são de médio a grande porte atingindo até 1,8 m quando adultos, apresentam cores que vão do amarelo ao negro, podem ser encontrados em locais úmidos e são conhecidos por serem muito ágeis e agressivos (Castro *et al.* 2001, Marques & Sazima, 2003). As espécies desses grupos mais significativas para a saúde pública são *Bothrops atrox* (Linnaeus 1758), *Bothrops moojeni* (Hoge 1966), *Bothrops jararacussu* (Lacerda 1884),

*Bothrops leucurus* (Wagler 1824), *Bothropoides jararaca* (Wied 1824), *Bothropoides neuwiedi* (Wagler 1824), *Bothropoides erythromelas* (Amaral 1923) e *Rhinocerophis alternatus* (Duméril, Bibron & Duméril 1854) (Melgarejo 2003).

A diversidade de funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas das peçonhas ofídicas é consequência da presença de componentes adquiridos durante diversas fases evolutivas, o que garantiu uma mistura heterogênea de substâncias de natureza protéica ou não-protéica bastante tóxica e eficaz (Koh *et al.* 2006).

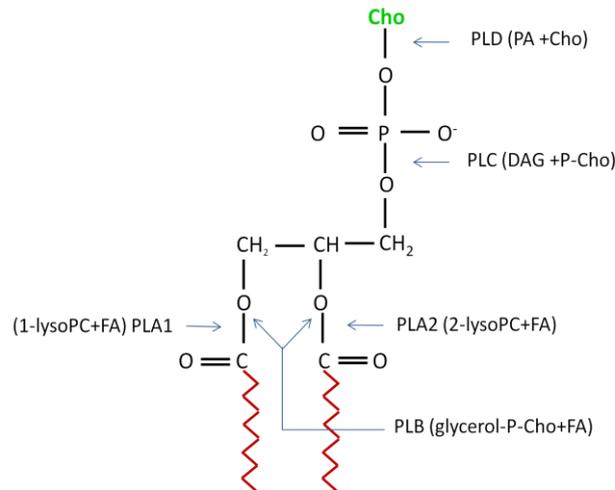
Aproximadamente 90% dos constituintes da peçonha botrópica e botropóica são protéicos, tratando-se de uma mistura com enorme variedade de substâncias farmacologicamente ativas que atuam sinergicamente na indução das alterações fisiopatológicas decorrentes do envenenamento. Também estão presentes citrato, íons metálicos, carboidratos, nucleotídeos e, em menor proporção, aminoácidos livres e lipídeos (Souza *et al.* 2001).

Na parte protéica, destacam-se os componentes enzimáticos como proteinases hemorrágicas (Tan & Ponnudurai 1991, de Roodt *et al.* 2003), ativador de protrombina (Dempfle *et al.* 1990), metaloproteinases fibrinogenolíticas (Rodrigues *et al.* 2000, 2001, Baldo *et al.* 2008), serinoproteases (Matsui 2000, Serrano & Maroun 2005) fosfolipases do tipo A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) (Abreu *et al.* 2007, Fontes *et al.* 1999, Oliveira *et al.* 2009, Soares *et al.* 2000), L-aminoacidooxidases (Ciscotto 2009, Izidoro 2006, Stábeli 2007, Tonismagi 2006), e componentes não enzimáticos como desintegrinas (Kamiguti *et al.* 1998, Usami *et al.* 1994, Wenson *et al.* 2004) e lectinas do tipo C (Clemetson *et al.* 2001, Hirabayashi *et al.* 1991, Weis *et al.* 1991).

### **Fosfolipases**

As fosfolipases (PL) podem, de maneira geral, receber diferentes designações em função do sítio de clivagem, podendo ser classificadas como do tipo: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C e D, (Figura 1). ).

A superfamília de PLA<sub>2</sub>s atualmente são classificadas em 15 grupos e subgrupos e incluem 5 tipos distintos de enzimas de acordo com o trabalho de Schaloske & Dennis (2006). São elas as PLA<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>), a PLA<sub>2</sub> citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), as PLA<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> independentes (iPLA<sub>2</sub>), as acetilhidrolases ativadoras do fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e as PLA<sub>2</sub>s lisossomais (figura 2).



**Figura 1.** Hidrólise de fosfatidilcolina pela PLA<sub>1</sub>, PLA<sub>2</sub>, PLB, PLC e PLD e os respectivos produtos da reação (em parênteses). Liberação de ácido graxo e lisofosfolípeos pela hidrólise da ligação sn-2 do fosfolípido. Cho: colina, DAG: diacilglicerol, P-Cho: fosfocolina, FA: ácido graxo. Em vermelho, estão destacados os ácidos graxos e, em verde, o grupo polar colina associado ao fosfato (modificado de Aragão 2005).

As pequenas PLA<sub>2</sub> secretadas que possuem entre 14 e 18 kDa, contém entre 5 e 8 pontes dissulfeto, utilizam uma histidina no sítio de ação e requerem quantidades  $\mu\text{M}$  de  $\text{Ca}^{2+}$  para sua atividade. Estas podem ser subdivididas como do grupo IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, IV, IX, X, XIA, XIB, XII, XIII e XIV

As PLA<sub>2</sub> citossólicas possuem massa entre 61 e 114 kDa e também utilizam uma serina no sítio catalítico e requerem  $\text{Ca}^{2+}$  para sua atividade. Elas podem ser subdivididas como dos tipos GIVA, GIVB, GIVC, GIVD, GIVE ou GIVF de acordo com similaridades na sequência.

As cPLA<sub>2</sub> são encontradas no citosol de plaquetas e monócitos, podem requerer quantidades baixas de  $\text{Ca}^{2+}$  para sua atividade e acredita-se que essas enzimas sejam ativadas por estímulos ligados à transdução de sinal (Clark *et al.* 1991). Além de sua atividade catalítica, elas exercem uma variedade de atividades enzimáticas auxiliares apresentando papel significativo no remodelamento de fosfolípídeos nas células, na isquemia do miocárdio (Hazen *et al.* 1991), na liberação do ácido araquidônico (Lehman *et al.* 1993, Ponzoni & Cornaglia-Ferraris 1993), e na secreção de insulina (Gross *et al.* 1993, Ramanadham *et al.* 1993).

Outro grupo chamado de GVI são formados por PLA<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> independentes, que possuem uma serina no sítio catalítico, todavia não requerem Ca<sup>2+</sup> para sua atividade. Elas podem ser subdivididas como GVIA, GVIB, GVIC, GVID, GVIE ou GVIF.

Outras duas PLA<sub>2</sub>s que contém serina são designadas GVII e GVIII. As enzimas destes grupos hidrolisam o grupo acetil na posição sn-2 do PAF (1-O-alkyl-2-acetyl-sn-glycero-3-phosphocholine) portanto, originalmente chamadas de acetilhidrolases PAF (PAF-AH). Uma dessas enzimas é secretada (GVIIA). Esta enzima é também conhecida como PAF-AH plasmática ou PLA<sub>2</sub> lipoproteína-associada (Lp-PLA<sub>2</sub>). As outras duas enzimas GVIB e GVIII são enzimas intracelulares.

O último grupo é composto por uma enzima chamada de PLA<sub>2</sub>s lisossomal que foirecentemente purificada a partir de cérebro bovino. Essa enzima esterifica um grupo acil da hidroxila na posição C-1 da ceramida de fosfolípidos utilizando como doador um grupo acila. Essa PLA<sub>2</sub> foi primeiramente nomeada como O-sintase acylceramida (ACS) e sua atividade é independente de Ca<sup>2+</sup>.

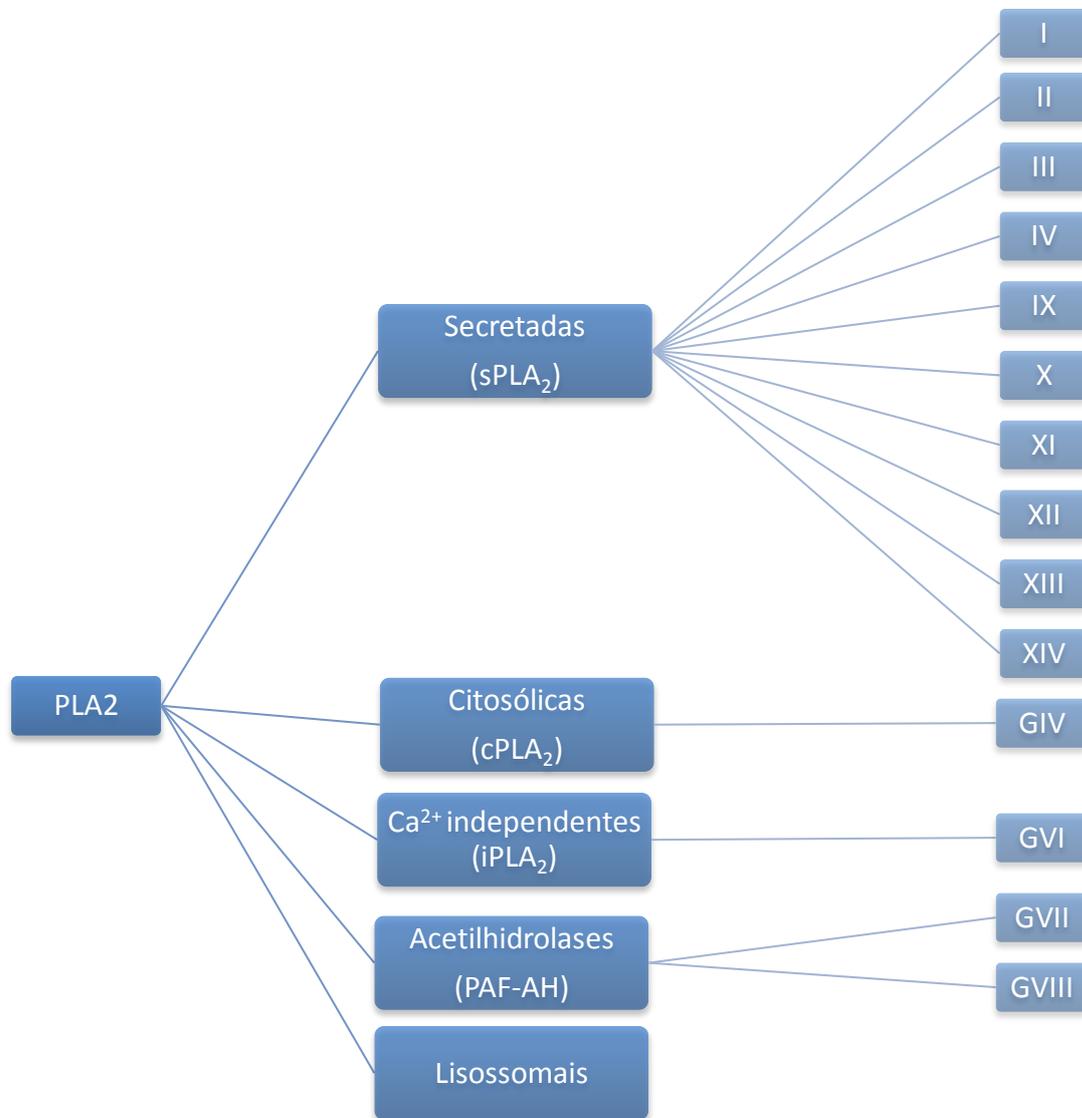
As PLA<sub>2</sub> secretadas estão subdivididas em vários grupos baseando-se principalmente na estrutura primária. As enzimas presentes em peçonhas pertencem aos grupos I, II, III e IV (Henrikson *et al.* 1977, Davidson & Dennis 1990) e são melhores descritas abaixo:

- Grupo I: enzimas encontradas no pâncreas de mamíferos e na peçonha de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae. São constituídas por aproximadamente, 115-120 resíduos de aminoácidos ligados por sete pontes dissulfídicas e são secretadas como zimogênios, manifestando sua atividade enzimática somente através da clivagem protéica e de forma limitada.

- Grupo II: enzimas com 120 a 125 resíduos de aminoácidos, encontradas em venenos de serpentes da família Viperidae e em células como plaquetas. Possuem uma cauda adicional na região C-terminal que forma uma ponte dissulfeto extra com um resíduo próximo ao sítio ativo His-48 (Henrikson *et al.* 1977).

- Grupo III: é representado pelas PLA<sub>2</sub> de peçonhas de abelhas e de lagartos pertencentes ao gênero *Heloderma*. Apresentam menor grau de similaridade em relação aos grupos I e II e tratam-se de glicoproteínas contendo de 130-135 resíduos de aminoácidos.

- Grupo IV: primeiramente foi isolada da peçonha de *Conus magus*. Essa proteína possui duas alças uma longa e uma curta, contendo 77 e 42 resíduos, respectivamente, unidas por uma ou mais pontes dissulfeto (McIntosh 1995).



**Figura 2. Classificação das PLA2** (compilado a partir de Schaloske & Dennis 2006).

As enzimas do grupo II despertam grande interesse por estarem envolvidas nos principais efeitos tóxicos observados nos envenenamentos ofídicos como a miotoxicidade, cardiotoxicidade, neurotoxicidade, inflamação, hipertensão, entre outros (Murakami & Kudo 2002).

Elas também podem ser classificadas em dois tipos de acordo com o resíduo presente na posição 49. As que contêm um aspartato (Asp-49) catalizam de maneira

dependente de  $\text{Ca}^{+2}$  e atuam na hidrólise de fosfolipídeos de membranas celulares na porção sn-2, liberando ácido araquidônico e induzindo a síntese de mediadores inflamatórios como as prostaglandinas, leucotrienos e tromboxanos (Mackessy 2009). Já as que contêm uma lisina na posição 49 (Lys-49), também chamadas de PLA<sub>2</sub>-símile, possuem baixa ou nenhuma atividade catalítica. Todavia, independente de capacidade de hidrolizar ou não fosfolipídeos, ambas causam danos celulares e por isso as PLA<sub>2</sub> Lys-49 têm atraído a atenção como modelos de indução de mionecrose por um mecanismo de ação cataliticamente independente (Delatorre *et al.* 2010, Polgár *et al.* 1996).

Como exemplo de enzimas Lys-49 que possuem pouca ou nenhuma atividade catalítica, porém apresentam atividade miotóxica intensa, podemos citar as PLA<sub>2</sub> Lys-49 extraídas das peçonhas de *Bothrops asper* (MT-II), *Bothrops jararacussu* (BTX-I), *Bothrops pirajai* (PrTX-I), *Bothrops moojeni* (MjTX-I) e *Bothropoides pauloensis* (BnSP-7) (Soares & Giglio 2003).

Existem também algumas variantes da subclasse Lys49, como Arg 49 e Ser 49 presentes em algumas PLA<sub>2</sub>s de peçonhas ofídicas já isoladas. Chijiwa *et al.* (2006) isolaram duas PLA<sub>2</sub>s da peçonha de *Protobothrops elegans* que possuem uma Arg na posição 49 (Arg49), e que possuem alto grau de homologia com as Lys49 já isoladas.

Possivelmente a ação miotóxica associada a estas enzimas deve-se à presença de resíduos hidrofóbicos e catiônicos próximos da região C-terminal (Calderon & Lomonte 1998). O fato de apresentarem sítios farmacológicos específicos torna possível a inibição de alguns efeitos indesejados e ativação de sítios de interesse, transformando-as em moléculas bastante promissoras do ponto de vista farmacológico (Kini 1997, Mackessy 2009).

### **Proteases**

A manutenção da hemostasia exige um equilíbrio delicadamente balanceado que é controlado pela integração de sinais e atividades na parede dos vasos, circulação de células sanguíneas e de proteínas plasmáticas (Du *et al.* 2006). Deficiências ou alterações nas proteínas envolvidas nesse balanço podem levar ao rompimento da hemostasia e gerar problemas bem conhecidos como a hemofilia, na qual pacientes não possuem o fator VIII, IX ou XI da coagulação (Oldenburg *et al.* 2004) ou ainda a

síndrome de Bernard-Soulier, na qual a glicoproteína Ib (GPIb) é ausente, causando plaquetopenia (Bithell *et al.* 1972).

No envenenamento botrópico, a perda do equilíbrio hemostático é uma das alterações mais evidentes e está geralmente associada à presença de proteases (metalo- ou serinoproteases) que atuam em diferentes níveis da cascata de coagulação (Usami *et al.* 1994, Rodrigues *et al.* 2000, Du *et al.* 2006).

As metaloproteases são encontradas desde bactérias até mamíferos, sendo que nas peçonhas de serpentes do gênero *Bothrops* e *Bothropoides* são o principal fator hemorrágico, motivo pelo qual também são conhecidas como hemorraginas.

As metaloproteases de serpentes (SVMP, do inglês “*Snake venom MetalloProtease*”) são proteínas com  $M_r$  variada, entre 22 e 100 kDa, devido a diferenças na composição do sítio catalítico dessas enzimas. Trata-se de hidrolases que dependem da ligação de íon metálico, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico, para a manifestação de suas atividades enzimáticas (Bjarnason & Fox 1994, Hite *et al.* 1994). Além disso, elas podem ser classificadas em  $\alpha$ - ou  $\beta$ -fibrinogenases, de acordo com o sítio de clivagem (cadeias  $\alpha$ - ou  $\beta$ - do fibrinogênio) (Braud *et al.* 2000, Matsui *et al.* 2000).

Os componentes da coagulação como o fibrinogênio, fibrina e/ou plaquetas, são os prováveis alvos de ação das SVMPs, mas também foram descritos efeitos proteolíticos sobre colágeno, laminina e fibronectina, principais componentes da matriz extracelular, e que estão envolvidos em inúmeros processos de adesão, remodelagem e integridade tecidual dos capilares e vênulas (Hayashi *et al.* 1998, de Clerck 2000, Bellon *et al.* 2004). Sua ação sobre esses constituintes desencadeia o desenvolvimento de fissuras teciduais pelas quais os componentes do sangue extravasam, esse processo é conhecido como hemorragia (Gutiérrez & Rucavado 2000, Gutiérrez *et al.* 2005).

As SVMPs tem se mostrado bastante sensíveis e sua estabilidade estrutural e funcional depende essencialmente de fatores, tais como pH, temperatura, e influência de íons (Moura-da-Silva *et al.* 2003, Xu *et al.* 2004).

As metaloproteases são classificadas de acordo com suas massas moleculares, em quatro grupos (Fox & Serrano 2008):

1) Do tipo I (P-I) contém apenas o domínio metaloprotease, com massa molecular variando entre 20 Kda a 30 Kda;

2) Do tipo II (P-II), contém dois domínios, o metaloproteásico e um domínio do “tipo-desintegrina”, com massas moleculares variando de 30 kDa a 60 kDa;

3) Do tipo III (P-III), contém três domínios, o metaloproteasico, o “tipo-desintegrina” e um domínio com alto conteúdo de resíduos de cisteína, com massa variando de 60 kDa a 90 kDa;

4) Do tipo IV (P-IV), com massa superior a 90 kDa e, possuindo em adição aos três domínios anteriormente citados, domínios lectina do tipo C (Bjarnason & Fox 1995)

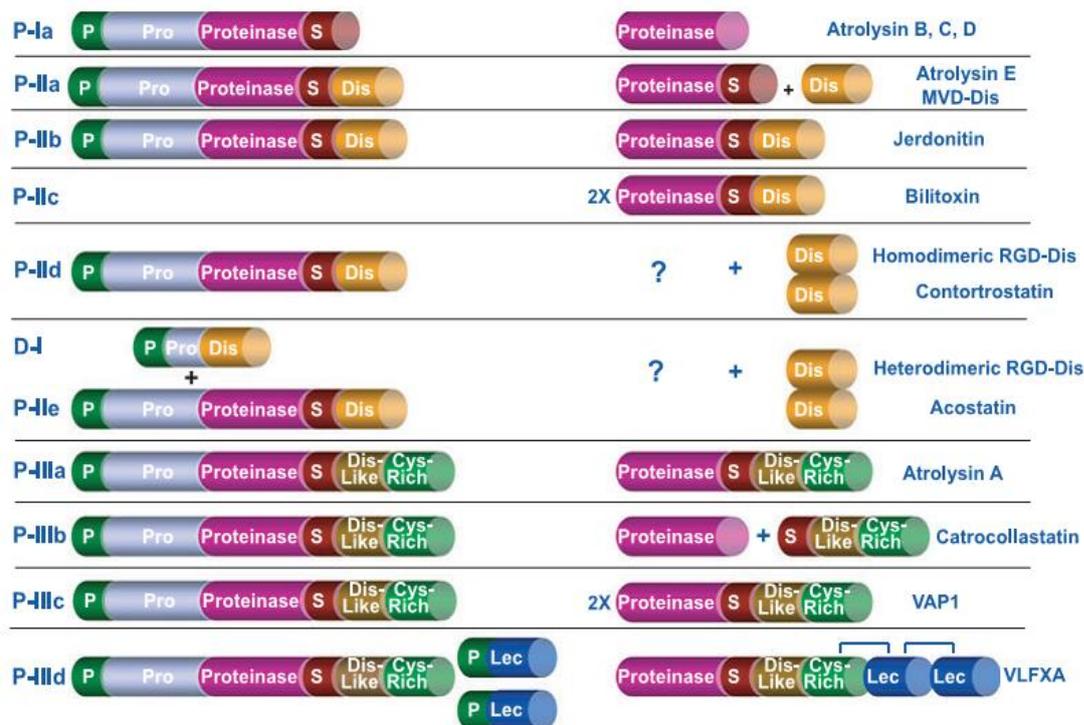
Segundo Bjarnason & Fox (1994), as SVMPs podem ser classificadas de acordo com a massa molecular e organização de seus domínios como do tipo P-I, P-II e P-III (Figura 3), onde:

- PI → São as SVMPs de baixa  $M_r$  (aproximadamente 24 kDa) com o domínio metaloprotease em sua forma madura caracterizado por uma seqüência de resíduos de aminoácidos (HEXXHXXGXXH) que se mantém conservada e normalmente pouca ou nenhuma atividade hemorrágica (Bode *et al.* 1993)

- PII → Essa classe inclui proteínas de  $M_r$  em torno de 35 kDa, com um domínio catalítico e um domínio tipo desintegrina adicional na porção C-terminal. Podem ser subdivididas em PIIa, PIIb, PIIc, PII d e PIIe de acordo com a possibilidade de processamento proteolítico e a formação de estruturas diméricas.

- PIII → A classe inclui as SVMPs possuem entre 55 e 95 kDa e, além do domínio catalítico e do tipo desintegrina, inclui um domínio rico em cisteína. Esta classe é a que apresenta maior atividade hemorrágica (com exceção da subclasse PIIId, que apresenta atividade hemorrágica fraca) e também pode ser divididas nas subclasses PIIIa, PIIIb, PIIIc e PIIId seguindo o mesmo padrão determinado nas P-II.

Os membros da subclasse PIIId são proteínas de alta  $M_r$  (95kDa), com atividade hemorrágica fraca. Elas contêm duas subunidades, uma constituída por todos os domínios da classe III e a outra por um domínio lectina tipo-C adicional na porção C-terminal, ligado através de uma ponte de enxofre. Este último modelo estrutural foi inicialmente proposto por Kini e Evans (1992), porém até o presente momento, nenhum mRNA PIV foi observado e, portanto, a estrutura PIV pode ser simplesmente uma modificação postraducional da estrutura PIII, e por isso, nesse novo sistema de classificação, a classe PIV passa a ser uma subclasse de PIII.



**Figura 3. Representação esquemática das classes de SVMPs.** As figuras marcadas com uma interrogação (?) indicam que o produto processado não foi identificado nas peçonhas (Fox & Serrano 2008).

As serinoproteases (SP) são formadas em sua maioria por apenas um monômero com massa molecular entre 26-33 kDa. e que apresentam 67% de similaridade entre si. (Matsui *et al.* 2000).

Algumas SPs apesar de serem chamadas coagulantes, podem tornar o sangue incoagulável. Esse processo ocorre pela depleção preferencialmente da cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio, por meio da degradação dos fibrinopeptídeos A e/ou B e é denominado de fibrinogênese. Além disso, elas podem ativar ou inibir de forma seletiva fatores envolvidos na agregação plaquetária, coagulação e fibrinólise (Braud *et al.* 2000). Esse mecanismo, também conhecido como efeito trombina-símile, constitui uma etapa crítica da coagulação, onde serão iniciados a formação do coágulo de fibrina e a ativação de plaquetas e do fator V, VIII (Ouyang *et al.* 1992).

A defibrinogênese ocorre por mecanismos covalentes de catálise, onde uma tríade de resíduos composta por histidina, ácido aspártico e serina (His-Asp-Ser) se

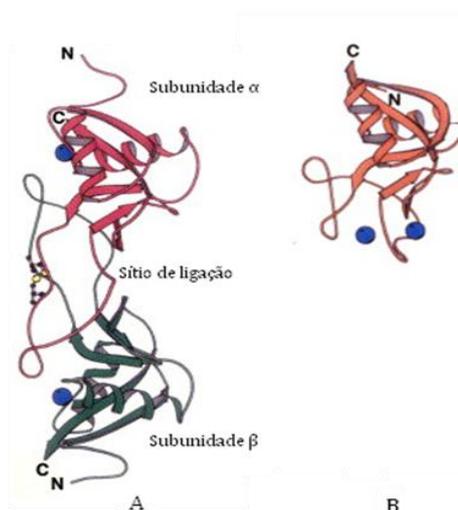
organizam em uma conformação espacial formando um sítio catalítico bem definido, que é característico dessas proteínas. Inicialmente elas são produzidas como zimogênio inativo e o sítio ativo só adquire a conformação eficiente após passar por proteólise. (Perona & Craik 1997).

### Lectinas

As lectinas pertencem a um grupo de proteínas não enzimáticas que geralmente ligam-se a carboidratos como os galactosídeos, são solúveis e requerem cálcio para sua atividade, atuando como agonistas ou antagonistas de algumas células (Komori *et al.* 1999, Braga *et al.* 2006, Du *et al.* 2006).

As lectinas encontradas nas peçonhas de serpentes (Hirabayashi *et al.* 1991, Weis *et al.* 1991) podem ser caracterizadas como hemaglutininas, que se ligam especificamente à lactose/galactose, chamadas de lectinas tipo-C (LTC), ou, apesar de terem o domínio de reconhecimento de carboidratos, não o reconhecem sendo assim classificados como lectinas tipo-C-símile (LTC-símile).

Enquanto as LTC são proteínas homodiméricas, as LTC-símile são geralmente heterodiméricas, podendo ser encontradas como oligômeros ou heterodímeros (Figura 4). As subunidades possuem sequências homólogas e são geralmente unidas por pontes dissulfeto (Clemetson *et al.* 2001).



**Figura 4.** Comparação estrutural entre uma lectina do tipo-C-símile e uma lectina tipo-C. (A) Estrutura de uma LTC-símile ligada a um fator de coagulação onde a subunidade  $\alpha$  e a subunidade  $\beta$  são representadas na cor magenta e verde, respectivamente e as esferas azuis indicam os íons cálcio. (B) Estrutura de uma lectina tipo-C. As esferas azuis indicam os íons cálcio (Modificado de Morita 2005).

As LTC possuem atividades biológicas como hemaglutinação, indução da agregação plaquetária, hipotensão, inibição de tumores, indução de edema e efeitos renais. As principais LTC descritas são a *BaL* ou trombolectina (Gartner *et al.* 1980), *BjL* (Ozeki *et al.* 1994, Cidade *et al.* 2006), *BjcuL* (Pereira-Bittencourt *et al.* 1999, Panunto *et al.* 2006) e *BpL* (Havt *et al.* 2005). Já as LTC-símile estão intimamente relacionadas a eventos biológicos como a indução da agregação plaquetária, apoptose, atividade antibacteriana, aglutinação de hemácias, plaquetas e outras células, precipitação de polissacarídeos e outras glicoproteínas e a inibição de trombina e protrombina. Bothrojaracin (Zingali *et al.* 1993) e Bothrojaracin-símile (Castro *et al.* 1999, Oliveira-Carvalho *et al.* 2008 ) são exemplos de LTCs-símile encontradas em diferentes espécies.

### **Potencial biotecnológico das peçonhas de serpentes**

Apesar de tantos efeitos tóxicos como os acima descritos, as peçonhas em geral constituem uma rica fonte de moléculas com importantes propriedades farmacológicas e que possuem um grande potencial para a produção de novos medicamentos (Stocker, 1999; Koh *et al.* 2006). Os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPP's), por exemplo, estão associados ao controle da pressão sanguínea e a muitos outros processos fisio-patológicos.

Os BPP's são uma classe de inibidores naturais da enzima conversora de angiotensina I (ECA I) e angiotensina II (ECA II) descobertos a partir da peçonha de *B. jararaca*. Esses peptídeos são ricos em resíduos de prolina, possuem um ácido piroglutâmico na porção N-terminal e geralmente uma seqüência Ile-Pro-Pro na porção C-terminal (Ferreira 1965, 1970, 1998).

O trabalho com tais moléculas isoladas da peçonha de *B. jararaca* iniciado em 1965 por Sérgio Ferreira e colaboradores levou ao desenvolvimento do Captopril<sup>®</sup>, o primeiro inibidor do sítio ativo da ECA, e a droga mais utilizada no tratamento da hipertensão até hoje.

Atualmente, além dos BPPs, pesquisas demonstram uma grande diversidade funcional e estrutural de componentes capazes de fornecer informações biológicas (Bjarnason & Fox 1994, Gutiérrez 2002, Pal *et al.* 2002), com várias aplicações biotecnológicas como:

- Analgésicos (Rajendra *et al.* 2004, Cury & Picolo 2006);

- Antiinflamatórios (Soares *et al.* 2003);
- Antimicrobianos (Andreu 1998, Rodrigues *et al.* 2004, Gomes 2005, Santamaria *et al.* 2005, Tonismagi *et al.* 2006, Nair *et al.* 2007);
- Antitumorais (Mora *et al.* 2005, Gebrim *et al.* 2009, Carvalho *et al.* 2001).

No período entre 1983 e 1994, 78% dos novos antibióticos e 61% dos novos antitumorais, foram obtidos de fontes naturais ou de seus derivados. (Petrovick *et al.* 1999). O potencial das moléculas isoladas à partir da peçonha de serpentes com atividade antimicrobiana e antitumoral, alvos do presente trabalho, são mais detalhadamente descritos a seguir.

### **Potencial antimicrobiano.**

As bactérias são microrganismos relativamente simples; unicelulares; procariontes; distinguíveis umas das outras por sua morfologia e por suas características metabólicas, antigênicas e genéticas; e abundantes na natureza. Podem estar associadas às plantas ou animais como residentes, em uma relação temporária, sem provocar doenças, como epífitas, em uma relação duradoura, ainda sem causar doenças, ou como patógenas, colonizando tecidos e provocando doenças. Os primeiros estudos envolvendo estes microrganismos datam por volta de 1673, quando Van Leeuwenhoek observou pela primeira vez microrganismos vivos (Tortora *et al.* 2005).

Antibiótico é uma substância que tem capacidade de interagir com microrganismos que causam infecções, inibindo ou anulando seu crescimento e apresentam diferentes propriedades químicas, físicas e farmacológicas. A síntese de diversos antimicrobianos contribuiu para o tratamento de infecções causadas por bactérias resistentes, entretanto, nos dias atuais, algumas bactérias se tornaram mais resistentes aos agentes antimicrobianos padrões como resultado de mudanças cromossômicas, ou pela troca de material genético via plasmídios ou transposons (Livermore 1995).

Os padrões de resistência têm sido explicados principalmente por modificações de proteínas específicas na constituição da membrana externa, “*outer membrane protein*” (Omp), aperfeiçoamento da bomba de efluxo e produção de enzimas capazes de hidrolisar antibióticos (Bush *et al.* 1995, Frere 1995, Poirel *et al.* 2000).

Essa resistência gera consequências graves para a saúde pública em todo mundo, por isso o interesse em investigar e produzir novas substâncias com atividade

contra esses microorganismos vem aumentando (Goodman & Gilman's 1996). A ocorrência dos casos mais antigos foram com cepas de *Staphylococcus aureus* resistentes à oxacilina e hoje, nos hospitais, a resistência bacteriana é fonte de preocupação constante. (Jones & Pfaller 1998, Sader 2000).

Estudos têm mostrado que a ocorrência deste tipo de resistência é decorrente da disseminação de bactérias resistentes (Sader *et al.* 1994). Casos esporádicos de infecções causadas por *S. aureus* com sensibilidade diminuída a vancomicina já foram descritos (Jones *et al.* 1998, CDC 2000).

Outro problema de resistência bacteriana muito importante é a resistência aos  $\beta$ -lactâmicos mediada pela produção de  $\beta$ -lactamase de espectro ampliado (ESBL). Estas são produzidas por espécies muito frequentes no ambiente hospitalar, como *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Proteus mirabilis* e, mais raramente, *Enterobacter sp.*, e degradam todos os  $\beta$ -lactâmicos com exceção dos carbapenems, as cefalosporinas de quarta geração e as cefamicinas (Bush *et al.* 1995, Santos *et al.* 2008).

As infecções causadas por bactérias multirresistentes, na maioria das vezes, estão associadas com infecções adquiridas no ambiente hospitalar, gerando grande impacto socioeconômico devido ao prolongamento do período de hospitalização, ao aumento da morbidade e mortalidade, aos custos decorrentes do maior número de exames subsidiários, ao uso de medicamentos coadjuvantes e à necessidade de antibióticos mais potentes, mais tóxicos e mais caros. Tal situação pode ser agravada pelo fato das bactérias multirresistentes expressarem mais de um mecanismo de resistência, o que limita as opções terapêuticas e agrava o quadro clínico (Jones 1996a, b, Travers & Barza 2002, Marra *et al.* 2006, Santos *et al.* 2008).

Vários estudos demonstram o potencial antimicrobiano das peçonhas de serpentes neotropicais. No geral, peçonhas de serpentes das famílias Elapidae e Viperidae são as mais ativas contra bactérias (Stiles *et al.* 1991), especialmente as do gênero *Bothrops* (Páramo *et al.* 1998; Rodrigues *et al.* 2004; Stábeli *et al.* 2006).

Os estudos sobre resistência bacteriana envolvendo a peçonha de serpentes têm relatado essa atividade para enzimas como: PLA<sub>2</sub> de *Bothrops asper* (Páramo *et al.* 1998, Lomonte *et al.* 1999a,b, Santamaría *et al.* 2004, 2005); PLA<sub>2</sub> de *Bothrops neuwiedi pauloensis* (Soares *et al.* 2000, Rodrigues. *et al.* 2004); PLA<sub>2</sub> de *Bothrops jararacussu* (Roberto *et al.* 2004); PLA<sub>2</sub> de *Bothrops pirajai* (Soares *et al.* 2001);

PLA2 de *Bothrops moojeni* (Stábeli *et al.* 2007); PLA2 de *Crotalus durissus terrificus* (Soares *et al.* 2001, Toyama *et al.* 2003), metaloproteases de *Bothrops jararacussu* (Mazzi *et al.* 2004), L-aminoácido oxidase de *Bothrops alternatus* (Stábeli *et al.* 2004) e L-aminoácido oxidase de *Bothrops pirajai* (Izidoro *et al.* 2006).

Duas fosfolipases, isoladas do veneno de *B. asper*, agem de forma direta tanto em bactérias Gram-positivas como Gram-negativas, sendo que um dos homólogos de Lys49 é cataliticamente inativo, mostrando que a atividade catalítica é independente da atividade bactericida (Páramo *et al.* 1998). As PLA<sub>2</sub> lys-49 de *B. brazili* (MTX-I e II) apresentaram atividade antimicrobiana contra *E. coli* e *C. albicans* (Costa *et al.* 2008).

No caso das PLA<sub>2</sub>, os resultados obtidos sugerem uma atividade biológica independente da atividade catalítica e indicam ainda que a composição de aminoácidos, bem como as cargas positivas e hidrofóbicas da região C-terminal estejam envolvidas no processo de danificação de membranas Ca<sup>+2</sup> independente. Todavia os detalhes sobre esses mecanismos ainda não foram completamente desvendados (Aragão 2005).

### **Potencial antitumoral**

O crescimento normal de um tecido é resultante do equilíbrio entre a taxa de proliferação e destruição celular, ou seja, de mitose e apoptose. Portanto, é necessário um balanço delicado entre reguladores de vias pró e antiapoptóticas que controlam esse processo garantindo a manutenção da homeostase (Denmeade & Isaacs 2005).

O processo de carcinogênese se inicia quando este equilíbrio é alterado em favor do prolongamento da sobrevivência celular, situação que acontece após uma série de alterações moleculares que fazem com que a célula adquira o fenótipo maligno (Denmeade & Isaacs 2005).

Diferentes sistemas regulatórios precisam estar alterados para que uma célula normal cresça como um câncer, isto é, elas precisam adquirir cinco ou seis características ou habilidades para serem consideradas malignas. A primeira característica é o crescimento mesmo na ausência de sinais de indução, ou seja, as células cancerígenas continuam a se dividir em situações nas quais células normais aguardariam em repouso por uma sinalização química. A segunda é o crescimento apesar dos comandos de “pare” emitidos pelas células adjacentes que estão sendo comprimidas pela expansão do tumor. A terceira é a evasão de mecanismos de morte celular programada. Em células saudáveis, um dano genético em um nível crítico,

geralmente ativa os mecanismos apoptóticos, todavia, as células cancerígenas ignoram esses comandos. A quarta é a habilidade para estimular a angiogênese. Como os tumores necessitam de oxigênio e nutrientes para sobreviver, eles estimulam a formação de novos vasos sanguíneos. A quinta característica é uma imortabilidade efetiva. Uma cultura de células humanas normais para de se dividir após 50 a 70 gerações, enquanto as células malignas agem manipulando seus telômeros, forçando o limite reprodutivo. A sexta propriedade é a habilidade de invadir um tecido próximo e produzir metástase se espalhando por outros órgãos, o que dá ao câncer seu caráter letal (Hahn & Weinberg. 2002).

Tumor ou neoplasia é, portanto, uma massa anormal de tecido que ocorre quando as células passam a se dividir sem controle e ficam com a capacidade de sofrer apoptose alterada. Quando essas células anormais (tumorais) adquirem a capacidade de invadir tecidos vizinhos, eles se tornam malignos, e esse processo é conhecido como metástase (Rádis-Baptista 2005).

Existem vários tipos de câncer. O carcinoma começa na pele ou nos tecidos que revestem os órgãos internos. O sarcoma é um tumor que começa nos ossos, músculos, cartilagem, gordura, vasos sanguíneos, ou no tecido conjuntivo. A leucemia é o câncer que começa nos tecidos hematopoiéticos, como a medula óssea, e faz com que um grande número de células anormais passem a ser produzidas e entrem na corrente sanguínea. O linfoma ou mieloma múltiplo são tumores que se iniciam nas células do sistema imunológico (NIC 2011).

O conceito de morte celular por apoptose, contrastando com o de necrose, foi proposto há 39 anos por Kerr *et al.* (1972). Enquanto a apoptose é descrita como um fenômeno ativo, altamente ordenada a ponto de ser chamada de morte programada, a necrose é um processo passivo, que ocorre de maneira abrupta ou acidental, resultado de perturbações químicas ou físicas, com a liberação descontrolada de conteúdo celular e mediadores. O fenômeno apoptótico é necessário, fundamental e altamente organizado para o desenvolvimento e a manutenção da integridade do organismo, e é tão complexo quanto a divisão e a diferenciação celulares. O desencadeamento da apoptose é coordenado tanto no desenvolvimento embrionário e na renovação tecidual como na resposta patológica à lesão celular (ruptura do DNA) ou à infecção por patógenos, ou seja, situações que representam ameaças à integridade do organismo (Chauffaille 2005).

Um dos mecanismos pelos quais a apoptose pode ser deflagrada é através dos receptores de morte presentes na superfície celular, que são ativados em resposta ao acoplamento de ligantes específicos. A maioria dos receptores da morte já identificados são membros da superfamília de receptores para o fator de necrose tumoral (FNT) e são caracterizados por apresentar porção extracelular rica em cisteína e uma região citoplasmática, chamada cadeia da morte ("death domain"), essencial para transdução intracelular do sinal de morte (Atsumi *et al.* 1998).

Alguns componentes isolados das peçonhas de serpentes podem apresentar atividade citotóxica (apoptótica ou necrótica), exercer atividade sobre a adesão celular ou ainda interferir no processo de angiogênese, atividades que podem contribuir para a morte ou redução de um tumor, tornando-se bons candidatos para serem utilizados como antitumorais. As PLA<sub>2</sub>, desintegrinas, lectinas e metaloproteases são algumas das principais moléculas com tais atividades já descritas (Gebrim *et al.* 2009, Rodrigues *et al.* 2009, Carvalho *et al.* 2001, Black *et al.* 1997, Moura-da-Silva 1996).

Estudos recentes propõem que a atividade citotóxica de algumas PLA<sub>2</sub> sobre linhagens de células tumorais podem estar associadas principalmente com a indução de apoptose, considerando que elas supostamente agem como mediadores de apoptose em vários modelos, incluindo diferentes linhagens celulares (Cummings *et al.* 2000). Estudos indicam que a atividade fosfolipásica aumenta a movimentação de fosfolipídios, o que pode levar a mudanças em membranas durante o processo de morte celular programada (Panini *et al.* 2001).

Diversas PLA<sub>2</sub>s isoladas das peçonhas de serpentes apresentam atividade citotóxica. As do grupo *B. neuwiedi*\* que apresentaram atividade sobre linhagens de B16F10 (melanoma) e K-562 (leucemia), sendo ainda capazes de induzir a proliferação celular de HLL (fibroblastos) de forma dose dependente (Daniele *et al.* 1997, Ferreira *et al.* 2008).

As miotoxinas de *B. brazili* (MTX-I e II) também apresentaram atividade citotóxica contra a linhagem tumoral Jurkat (Costa *et al.* 2008) e BmooTX-I mostrou-se tóxica sobre linhagens tumorais humanas e de camundongos, sendo menos citotóxica

---

\* A terminologia “grupo *B. neuwiedi*” refere-se ao grande agrupamento do ponto de vista filogenético (ou monofilético), contendo várias espécies descritas na revisão taxonômica realizada por Silva & Rodrigues (2008), incluindo agora a nova espécie que passa a fazer parte do grupo.

sobre linhagens de células normais (macrófagos) (Aragão 2005). Todos esses estudos sugerem o emprego de PLA2s como potentes drogas anti-câncer

Outras moléculas com a capacidade de se ligar a integrinas e interferir na adesão celular, também parecem ser promissoras no uso contra tumores. Por exemplo, algumas integrinas expressas em membranas de plaquetas são alvos de várias toxinas de serpentes que inibem ou promovem a agregação plaquetária (Andrews & Berndt 2000, Andrews *et al.* 2001). Dentre as toxinas mais envolvidas nesses processos estão as famílias de desintegrinas, lectinas do tipo-C, e metaloproteases como a agretina de *Calloselasma rhodostoma* (Chung *et al.* 2001); bilinexina de *Agkistrodon bilineatus* (Du *et al.* 2001); crovidisina de *Crotalus viridis* (Liu & Huang 1997); EMS16 de *Echis multisquamatus* (Horii *et al.* 2003); jararagina de *Bothrops jararaca* (de Luca *et al.* 1995, Kamiguti *et al.* 1996); rhodocetina de *Calloselasma rhodostoma* (Wang *et al.* 1999), batroxostatina de *Bothrops atrox* (Rucinski 1990); bothrocetin de *Bothrops jararaca* (Fujimura *et al.* 1991).

As integrinas medeiam um processo de sinalização que interfere em várias funções celulares como a adesão, migração celular, crescimento e sobrevivência, diferenciação e desenvolvimento, reparação tecidual, hemostasia e até mesmo apoptose (Berman & Kozlova 2000).

Os locais de contato entre as integrinas são regiões importantes para a transdução de sinal. Através de *clusters* de integrinas, ocorre o crescimento celular e migrações normais. Apesar da perda desse contato poder estimular o crescimento de células tumorais, bem como reforçar a capacidade de invasão das células tumorais, por outro lado, essa perda de contato também pode induzir apoptose *in vitro* (Schwartz & Ingbert 1994).

As integrinas possuem uma característica particular de estarem diferencialmente distribuídas nos tecidos humanos adultos. Por exemplo, algumas integrinas são diferentemente expressas em alguns tipos de tumores invasivos, correlacionando com a agressividade do câncer. Por isso, uma estratégia para minar a progressão do câncer é a marcação de integrinas de células tumorais ou células endoteliais vasculares recrutadas (Ust *et al.* 2002).

Diversos trabalhos têm relatado a capacidade de alguns componentes pertencentes à família das metaloproteases, lectinas do tipo-C e desintegrinas, de inibir a migração celular *in vitro*, a adesão, o descolamento, a proliferação celular e a progressão do tumor *in vivo* interagindo especificamente com algumas integrinas nas membranas celulares (Carvalho *et al.* 2001, Kamiguti *et al.* 1998, Markland 1998, Pereira-Bittencourt *et al.* 1999).

Por exemplo, metaloproteases/desintegrinas, extraídas a partir da peçonha da cascavel *Crotalus atrox*, induzem a morte celular por apoptose *in vitro* de células endoteliais vasculares (Masuda *et al.* 1997, 1998). A crovidisina, outra metaloprotease purificada a partir da peçonha de *Crotalus viridis* provoca descolamento de células de osteossarcoma, mas não de osteoblastos cultivados a partir de proteínas da matriz extracelular. A proteólise de proteínas da matriz extracelular pela crovidisina implicou em descolamento seletivo (Tang *et al.* 2004).

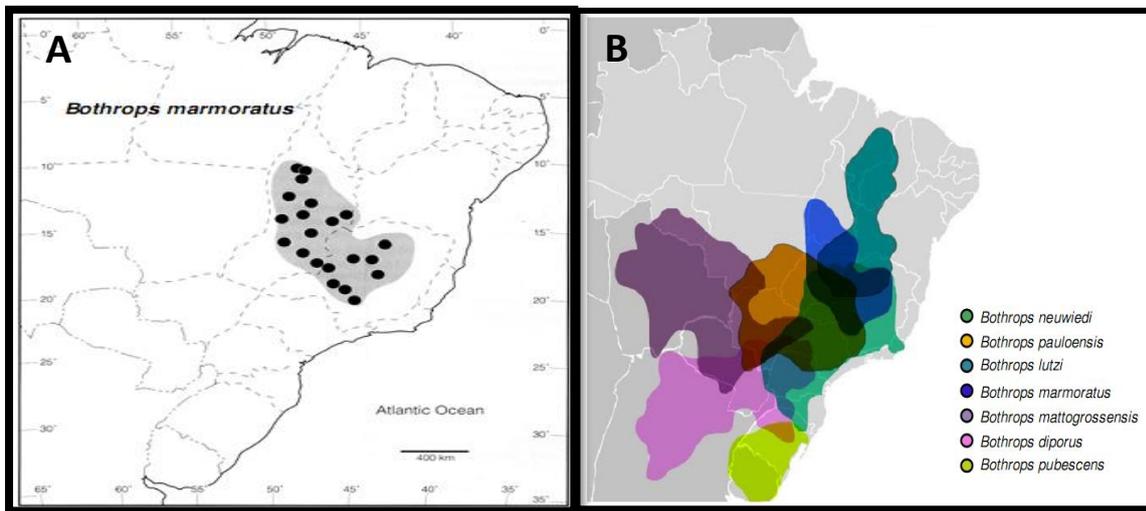
A perspectiva do desenvolvimento de um tratamento coadjuvante para o câncer a partir de toxinas de serpentes como as metaloproteases, desintegrinas e lectinas é promissor. Até agora, a complexação de toxinas integrinas-alvo com lipossomos, melhora sua eficácia, meia-vida na circulação e facilita sua administração. Por exemplo, o gene salmosin administrado por via subcutânea com lipossomos catiônicos *in vivo*, implicaram em uma expressão sistêmica de seus produtos gênicos, inibindo o crescimento de células B16BL6 (melanoma) e suprimiu metástases pulmonares (Kim *et al.* 2003). Outro exemplo é a liberação de contortostatina, uma desintegrina isolada da peçonha de *Agkistrodon contortrix contortrix* em lipossomo, por meio da administração intravenosa, que mantém a potente atividade antiangiogênica da toxina e impede a progressão do câncer de mama, como ficou demonstrado com um modelo de tumor mamário humano (Wenson *et al.* 2004).

As publicações sobre atividade bactericida e antitumoral das toxinas de serpentes são, em sua maioria, descritivos, e ainda não existem modelos consistentes que expliquem esses efeitos. O que se têm até o presente momento são basicamente evidências das atividades farmacológicas. Por esse motivo, muitos desses componentes podem ser inadequados para uso imediato, porém servem como base ou modelos para novos fármacos com grande potencial biotecnológico.

### A espécie *Bothropoides marmoratus*

O grupo de serpentes antes classificadas como *Bothrops neuwiedi* (Amaral, 1925), também conhecidas como jararacas-pintadas, representam a terceira espécie mais comum entre as jararacas no Brasil.

Recentemente, após revisão taxonômica (Silva & Rodrigues 2008) reconhecida pela Sociedade Brasileira de Herpetologia (Bérnils 2009), este grupo foi reclassificado em sete espécies distintas, encontradas em diferentes regiões de toda a América do Sul (Figura 5), sendo seus nomes *B. pauloensis*, *B. mattogrossensis*, *B. pubescens*, *B. diporus*, *B. lutzi*, *B. neuwiedi* e uma nova espécie denominada *B. marmoratus*, alvo do presente estudo.



**Figura 5.** (A) Mapa evidenciando a distribuição geográfica da espécie *B. marmoratus* e (B) sobreposição das distribuições geográficas das espécies do grupo *B. neuwiedi* compilado a partir de Silva (2004) (Machado 2010).

Outro trabalho recente realizado por Fenwick e colaboradores (2009) fez uma reclassificação do gênero *Bothrops*, *Bothriopsis* e *Bothrocophias* baseado em evidências moleculares e morfológicas e alterou o nome de diversas espécies. Segundo essa nova classificação, foi criado um novo gênero o qual inclui as espécies: *Bothropoides alcatraz*, *Bothropoides diporus*, *Bothropoides erythromelas*, *Bothropoides insularis*, *Bothropoides jararaca*, *Bothropoides lutzi*, *Bothropoides mattogrossensis*, *Bothropoides neuwiedi*, *Bothropoides pubescens*, *Bothropoides pauloensis* e *Bothropoides marmoratus*. Essa nova nomenclatura será a partir de agora adotada nesse estudo.

A nova espécie *Bothropoides marmoratus* (Figura 6) apresenta distribuição nos estados de Goiás, Tocantins e oeste de Minas Gerais, que coincide exatamente com a região de Cerrado do Brasil Central. (Silva & Rodrigues 2008).



**Figura 6.** *Bothropoides marmoratus* (Marco Antônio de Freitas).

Os estudos realizados, sejam com dados morfológicos ou moleculares, demonstram que a compreensão das relações filogenéticas das espécies do grupo *neuwiedi* está apenas começando, e reforça a necessidade de que mais estudos sejam desenvolvidos, a partir de dados bioquímicos, moleculares, osteológicos, anatômicos e ecológicos, como indicam trabalhos recentes com abordagem multidisciplinar (Wüster *et al.* 2005, Sanders *et al.* 2006, Fenwick *et al.* 2009).

A espécie *B. marmoratus* é caracterizada por escamas supralabiais pontilhadas, em vez das manchas bem evidentes, presentes nas demais espécies, uma discreta listra branca nas escamas pós-orbitais, mais difícil de ser notada, e de 15 a 27 manchas na região dorsolateral escuras margeadas de branco e com formato trapezoidal. Seu padrão de coloração, juntamente com as bordas difusas das manchas, conferem um aspecto marmóreo a esta serpente.

Os componentes da peçonha de serpentes pertencentes do grupo *B. neuwiedi* ainda são pouco conhecidos comparando com outras serpentes do gênero botrópico. Além disso, devido às recentes mudanças de nomenclatura taxonômica ocorridas, muitas das toxinas descritas para a espécie *B. neuwiedi* devem ser reclassificadas, pois podem pertencer a espécies distintas. A tabela 1 mostra uma lista com algumas toxinas descritas, isoladas das peçonhas de serpentes do grupo *B. neuwiedi*.

As toxinas extraídas de venenos e peçonhas animais fascinam o homem há muito tempo devido a suas implicações farmacológicas. Com base nesses efeitos, laboratórios farmacêuticos do mundo todo têm utilizado essas toxinas como modelos para o desenvolvimento de novas drogas. As pesquisas no campo de toxinas contribuem muito para a compreensão dos mecanismos de ação e possíveis aplicações das novas moléculas encontradas e já serviram de protótipos para o desenvolvimento de algumas drogas disponíveis comercialmente.

Todavia, para que esse tipo de produto chegue ao consumidor, além das pesquisas com moléculas biologicamente ativas é preciso desenvolver o processo de formulação com vistas à produção em escala industrial e alcançar o processamento final, o que tem ocorrido muito pouco no Brasil. Nos últimos anos, as questões dos medicamentos vêm ganhando espaço na agenda governamental e na sociedade, contudo apesar dos medicamentos terem se tornado imprescindíveis para a sociedade e para o Estado, pouco da produção científica tem sido aproveitada pelas empresas.

O Brasil e, particularmente, o Cerrado que é considerado o segundo maior bioma do país e a Savana com a maior biodiversidade do mundo, possui um vasto potencial para extração de moléculas biologicamente ativas e a conseqüente produção de novos fármacos e biofármacos. Este estudo é justificado pela necessidade de se explorar o potencial e a riqueza desta região, especialmente da nova espécie descrita a partir da reclassificação do grupo *neuwiedi*, *Bothropoides marmoratus*, e tem como objetivo contribuir com a produção técnico-científica e farmacêutica, além de avançar na caracterização química e biológica da peçonha dessa nova espécie.

Com o desenvolvimento do presente projeto, buscou-se a identificação e caracterização de proteínas com atividade antimicrobiana e/ou antitumoral provenientes da peçonha de *Bothropoides marmoratus*, esperando fomentar a indústria farmacêutica com promissoras ferramentas farmacológicas.

Tabela 1 . Lista de toxinas publicadas das serpentes do grupo *neuwiedi*.

ESPÉCIE	TOXINA	Mr (KDa)	ATIVIDADE	REFERÊNCIA
<i>B. neuwiedi</i>	PLA <sub>2</sub>	nd	Inibição da cadeia transportadora de elétrons	Vidal <i>et al.</i> 1966
<i>B. neuwiedi</i>	Metaloproteínas (NHFa e NHFb)	46 e 58	Hemorrágica, miotóxica	Mandelbaum <i>et al.</i> 1984, Queiroz <i>et al.</i> 1985
<i>B. neuwiedi</i>	Proteína	60	Ativador de protrombina	Govers-Riemslog <i>et al.</i> 1987
<i>B. neuwiedi</i>	Metaloproteínas	nd	Antigênica	Mandelbaum & Assakura 1988
<i>B. neuwiedi</i>	Peptídeos (BPP-II, BPP-III, and BPP-V)	1,372 ; 1,046 e 1,078	Potencializador de bradicinina	Ferreira <i>et al.</i> 1998
<i>B. neuwiedi</i>	P1	15	PLA <sub>2</sub> , anticoagulante, edematogênico	Daniele <i>et al.</i> 1995
<i>B. neuwiedi</i>	P2	16,2	PLA <sub>2</sub> , anticoagulante	Daniele <i>et al.</i> 1995
<i>B. neuwiedi</i>	P3	15	PLA <sub>2</sub> , citotóxico	Daniele <i>et al.</i> 1997
<i>B. neuwiedi pauloensis</i>	Miotoxina (BnSP-6)	13,5	Miotóxica	Rodrigues <i>et al.</i> 1998
<i>B. neuwiedi pauloensis</i>	Miotoxina (BnSP-7)	13,727	Miotóxica, Edematogênica, PLA <sub>2</sub> , Necrótica, Inflamatória, antibacteriana, bloqueadora neuromuscular, lítica de membranas artificiais	Rodrigues <i>et al.</i> 1998, Soares <i>et al.</i> 2000, Oliveira <i>et al.</i> 2009
<i>B. neuwiedi</i>	Proteína (bothrojaracin-símile)	27	Inibidora de trombina e indutora de agregação plaquetária	Castro <i>et al.</i> 1999
<i>B. neuwiedi</i>	Metalloprotease (Neuwiedase)	22	Fibrinogenolítica, Miotóxica, inflamatória, hemorrágica, Anti- <i>Toxoplasma Gondii</i>	Rodrigues <i>et al.</i> 2000, 2001, Bastos <i>et al.</i> 2008
<i>B. n. pauloensis</i>	BnpTX-I e BnpTX-II	14	Bactericida, neurotóxica, miotóxica, edematogênica e citotóxica	Rodrigues <i>et al.</i> 2004
<i>B. neuwiedi</i>	PLA <sub>2</sub>	~15	Neuromuscular, PLA <sub>2</sub>	Abreu <i>et al.</i> 2007
<i>B. pauloensis</i>	Fosfolipase (Bp-PLA <sub>2</sub> )	15,8	Edematoênica e miotóxica	Rodrigues <i>et al.</i> 2007
<i>B. neuwiedi</i>	Metalloprotease (BnP1)	24	Miotóxica, hemorrágica, indutora de apoptose, fibrinogenolítica e fibrinolítica.	Baldo <i>et al.</i> 2008

<i>B. pauloensis</i>	PLA <sub>2</sub> Lys49 (Bp-12)	13,789	Bloqueio neuromuscular	Randazzo-Moura <i>et al.</i> 2008
<i>B. neuwiedi</i>	Peptídeos recombinantes (Neuwiedase)	nd	Antigênica	Cardoso <i>et al.</i> 2009
<i>B. pauloensis</i>	Enzima (Glicoproteína) trombina-símile (BpSP-I)	34	Procoagulante e kallikreina-símile, fibrinogenolítica, proteolítica	Costa <i>et al.</i> 2009
<i>B. neuwiedi</i>	Metalloproteínase (neuwiedase)	nd	Inflamatória	Lopes <i>et al.</i> 2009
<i>B. pauloensis</i>	LAAO (Bp-LAAO)	65	Leishmanicida, antitumoral, antibacteriana, indutora de agregação plaquetária	Rodrigues <i>et al.</i> 2009
<i>B. neuwiedi</i>	Bn IV	14	myotoxic	Delatorre <i>et al.</i> 2010

## **2. OBJETIVOS**

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1. OBJETIVO GERAL**

O presente trabalho teve como objetivo geral o isolamento, a identificação e a caracterização química e biológica de componentes da peçonha de *Bothropoides marmoratus*, sobretudo os compostos com atividade antimicrobiana e citotóxica.

### **2.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

❖ Realizar o fracionamento da peçonha bruta de *Bothropoides marmoratus* por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em sistema de fase reversa;

❖ Avaliar a atividade antimicrobiana, antitumoral e hemolítica das frações cromatográficas obtidas;

❖ Realizar a purificação das frações bioativas de interesse;

❖ Caracterizar química e biologicamente as frações bioativas de interesse.

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

### **3. MATERIAIS E MÉTODOS**

#### **3.1 Reagentes e soluções**

Todos os reagentes utilizados nas análises apresentaram grau analítico e foram obtidos dos representantes das empresas Sigma, Merk, Vetec, GE Healthcare, J.T. Baker e Biobrás. As soluções empregadas foram preparadas com água Milli-Q® (Millipore Reagent Water System, USA).

#### **3.2 Peçonha**

Neste trabalho, as serpentes foram classificadas morfológicamente como *Bothropoides marmoratus* de acordo com Fenwick e colaboradores (2009) e Silva & Rodrigues (2008). A extração da peçonha de 12 espécimes mantidos em cativeiro no Núcleo Regional de Ofiologia de Goiânia (NUROG) da Pontifícia Universidade Católica de Goiás (PUC-GO) foi realizada por massagem manual das glândulas e reunida em microtubos de centrifugação. Após a coleta, o material obtido foi centrifugado a 12.000 rpm por 15 minutos e apenas o sobrenadante foi coletado, imediatamente congelado em nitrogênio líquido e, em seguida, liofilizado. A peçonha seca foi alíquotada e congelada a -20°C até o momento do uso.

### **PRIMEIRA ETAPA – PURIFICAÇÃO E SCREENING DE ATIVIDADE BIOLÓGICA**

#### **3.3. Fracionamento da peçonha bruta (RP-HPLC)**

A peçonha bruta de *B. marmoratus* foi fracionada por meio de cromatografia líquida de alta eficiência em coluna de fase reversa (RP-HPLC) C<sub>18</sub> analítica (Vydac 218TP54, 4,6 x 250 mm) em um cromatógrafo Shimadzu. Os solventes utilizados foram: A – Solução aquosa de TFA 0,1% e B – Solução de acetonitrila com TFA 0,1% (v/v). Para cada cromatografia, 2 mg da peçonha bruta foram ressuspensas em 200 µL de Solvente A e centrifugadas a 10.000 rpm por 10 min. A coluna foi previamente equilibrada com 5% do solvente B e a eluição foi realizada aplicando-se um gradiente linear de 5 a 70% de solvente B em 65 min., com fluxo de 1mL/min em

temperatura ambiente e monitoramento a 216 e 280 nm, simultaneamente. As frações cromatográficas eluídas foram coletadas manualmente. Após cada corrida cromatográfica, a coluna foi lavada com 100% de solvente B e as amostras secas sob vácuo em Speed-Vac e armazenadas a -20°C.

### **3.4. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana**

Os ensaios para avaliação preliminar da atividade antimicrobiana com a peçonha bruta foi realizado com as bactérias Gram-negativas *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 27853), *Enterobacter cloacae* (ATCC 35030), *Proteus mirabilis* (ATCC 25933), *Klesbsiella pneumoniae* (ATCC 13884) e as Gram-positivas *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923), *Bacillus subtilis* (ATCC 19659), *Enterococcus faecalis* (ATCC 29212) e *Staphylococcus epidermidis* (ATCC 12228) obtidas do Banco de Culturas Tropicais da Fundação André Tosello (Campinas, SP). As linhagens bacterianas foram cultivadas em meio Mueller-Hilton a 37°C, sob agitação, por cerca de 18 horas até a obtenção de uma cultura com densidade óptica igual a 1,0 em 590 nm. Quando alcançaram a fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura nas proporções de 1:50 para Gram-negativas e 1:100 para Gram-positivas.

Primeiramente, foi realizado um ensaio com a peçonha bruta com diluições seriadas a partir de 300 µg/mL. A peçonha foi ressuspensa em 100 µL de meio de cultura estéril e, logo em seguida, filtrados com filtros Millex-GV de 0,22 µm da Milipore e só então foi feita a diluição direto na placa de poços, restando 50 µL em cada poço. Em seguida, foram adicionados 50 µL de cada uma das culturas bacterianas (contendo de 2 a 7 x 10<sup>5</sup> CFUs, dependendo da linhagem bacteriana empregada) e as placas foram incubadas a 37°C por 22 h.

Também foram realizados outros dois experimentos de modo a avaliar a atividade antimicrobiana das frações cromatográficas obtidas, sendo que as linhagens bacterianas usadas nesta etapa foram *Escherichia coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). No primeiro ensaio, cada uma das amostras cromatográficas foi ressuspensa em 200 µL de meio de cultura e, em seguida, 50 µL dessa solução foram transferidos para a placa de 96 poços. Em seguida, foram adicionados 50 µL da cultura bacteriana.

O outro ensaio foi preparado da mesma maneira, todavia com a adição de 10 mM de  $\text{CaCl}_2$  ao meio de cultura, para verificar se o íon cálcio poderia interferir na atividade de alguma das fração cromatográficas analisadas.

A taxa de inibição do crescimento bacteriano nos ensaios realizados foi determinada pela leitura da densidade óptica a 595 nm empregando-se uma leitora de microplacas BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA). Como controles da ausência de crescimento e de crescimento pleno foram utilizados, respectivamente, formaldeído 0,4% (v/v) e meio de cultura estéril.

### **3.5. Avaliação da atividade citotóxica**

A atividade citotóxica da peçonha bruta foi testada contra as linhagens celulares tumorais HeLa (câncer do colo do útero, linhagem humana) e B16F10 (câncer de pele, linhagem de murinos) e contra uma linhagem normal de fibroblastos de camundongos (NHI 3T3) todas obtidas no banco de células American Type Culture Collection (ATCC). A peçonha foi testada em concentrações obtidas por diluição seriada a partir de 300  $\mu\text{g}/\text{mL}$ . Foram dissolvidas em meio de cultura e filtradas em filtros Millex-GV de 0,22 $\mu\text{m}$  da Milipore antes do uso.

As linhagens tumorais humanas HeLa (câncer do colo do útero) e MCF7 (câncer de mama) foram tratadas com as 39 frações cromatográficas obtidas da peçonha bruta de *B. marmoratus*.

A viabilidade celular foi avaliada pelo método de MTT estabelecido por Mosmann (1983) e os ensaios foram realizados no Laboratório de Morfologia e Morfogênese da Universidade de Brasília. Todos os procedimentos foram realizados com materiais rigorosamente esterilizados e em câmara de fluxo laminar, cuja luz ultra-violeta permaneceu ligada por 30 minutos antes do uso.

As linhagens mantidas no banco de células em nitrogênio líquido foram descongeladas rapidamente a 37°C e 500  $\mu\text{L}$  das alíquotas foram lentamente adicionados em um frasco de cultura de células com 5 mL de meio de cultura DMEM completo (tamponado com bicarbonato de sódio, suplementado com 10% de soro fetal bovino e 1% de antibiótico) e incubados em estufa a 37°C e 5% de  $\text{CO}_2$  por 4 horas. Após esse período, as células foram observadas em microscópio de luz invertida a fim de conferir sua aderência ao substrato. Constatada a adesão, o meio de cultura era descartado e novos 5 mL de meio adicionados. Após 24h de incubação, as células foram

novamente observadas em microscópio de luz invertida sendo checados os perfis de crescimento celular, os aspectos morfológicos e a presença de contaminantes como bactérias ou fungos.

Ao atingir o estágio de confluência (elevada densidade de células em uma determinada área), as células foram removidas do frasco de cultura com uma solução de tripsina-EDTA e centrifugadas a 750 g por 5 minutos. O sobrenadante foi descartado e as células ressuspendidas em 1 mL de meio de cultura.

Para a determinação do número de células, 10  $\mu$ L da suspensão de células foi adicionado a 40  $\mu$ L de solução de azul tripan (0,4% diluído em PBS) e uma alíquota de 10  $\mu$ L da mistura foi depositada em uma câmara de Neubauer, onde as células foram contadas em microscópio de luz. O número de células foi determinado multiplicando-se o número total de células contadas pelo fator de diluição das células com o azul tripan (nesse caso, o fator foi 5), pela constante de  $10^4$  e, por fim, dividindo esse valor pelo número de quadrantes considerados na contagem (no caso, 4).

Para as linhagens Hela e MCF7 foram adicionadas  $8 \times 10^3$  e para B16F10 e NHI3T3  $7 \times 10^3$  células por poço em microplaca de 96 poços por 24 horas até que houvesse a completa adesão e só então tratadas com a peçonha bruta ou com as frações cromatográficas resultantes da reunião de 5 corridas cromatografias para cada fração.

Após um período de incubação de 24 horas em estufa, o meio de cultura das placas foi removido, 150  $\mu$ L de solução de MTT (10% de MTT em meio DEMEM) foram adicionados a cada poço e as células foram incubadas por 3 horas na estufa. Em seguida, o MTT foi removido e 100  $\mu$ L de DMSO adicionados a cada poço, sendo homogeneizado e por fim realizada a leitura da densidade óptica de cada poço.

A quantificação do formazan liberado pelas células viáveis foi realizada por meio da leitura da densidade óptica de cada poço no comprimento de onda de 595 nm em um espectrofotômetro conjugado a uma leitora de microplacas (BioRad 3550-UV). O controle positivo foi realizado por meio do tratamento das células apenas com o meio de cultura e como branco foi realizada a leitura de DMSO puro.

### **3.6. Avaliação da morfologia celular**

Outra forma de avaliar a viabilidade das células é pelo acompanhamento de sua morfologia, que pode apresentar diversas alterações desencadeadas pelos agentes citotóxicos. A microscopia de contraste de fase é especialmente útil no exame de

estruturas e organelas maiores como o núcleo e mitocôndrias de tecidos vivos, transparentes e não-corados. Ela produz imagens com diferentes graus de obscuridade ou luminosidade que é gerada pela passagem da luz do microscópio por um anel de contraste que atinge a amostra. Dessa forma é possível observar e analisar rapidamente a morfologia de células imersas em meio de cultura sem utilização de fixadores ou corantes.

No presente trabalho, após o período de tratamento descrito no item anterior, as células foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido (UNICO, EUA) para análise de possíveis alterações morfológicas. A aquisição das imagens foi realizada com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o *software* de aquisição Motic Images Plus 2.0.

### **3.7 Avaliação da atividade hemolítica**

Para verificar a atividade hemolítica foi utilizado o protocolo modificado de Onuma *et al.* (1999). Uma suspensão de eritrócitos humanos (tipo O, Rh<sup>+</sup>) obtidos no Hemocentro de Brasília foi preparada em tampão-salino (NaCl 150 mM, Tris-HCl 10 mM e CaCl<sub>2</sub> 10 mM pH 7,4) no momento do uso. Para a realização do ensaio, 100 µL da suspensão de eritrócitos foi incubada com 100 µL das frações cromatográficas (resultado da reunião de 5 corridas cromatográficas) obtidas com o fracionamento da peçonha bruta de *B. marmoratus* previamente ressuspendidas no mesmo tampão por 60 min à temperatura ambiente. Após o tempo de incubação, as amostras foram centrifugadas a 3.000 rpm por 2 min e 100 µL do sobrenadante foi transferido para uma microplaca de fundo chato com 96 poços, sendo realizada uma leitura da absorbância a 405 nm. Como controles positivo e negativo foram utilizados Triton X-100 1% e tampão-salino, respectivamente.

### **3.8. Análise por espectrometria de massa**

Neste trabalho, todas as frações cromatográficas foram analisadas com relação a sua composição peptídica/protéica por meio da determinação das massas moleculares experimentais dos componentes moleculares presentes em cada fração em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany). Cada fração foi dissolvida em 100 µL de TFA 0,1% e 1 µL da fração foi aplicado sobre os poços de placa de aço inoxidável específica para análise por MALDI. Logo em seguida, o mesmo volume de matriz foi adicionado à amostra e essa

mistura foi homogeneizada aspirando-se o líquido presente no poço por 4 vezes com a própria micropipeta. Foram utilizados 3 tipos de matrizes para análise da composição peptídica/protéica de cada fração cromatográfica. A primeira matriz foi preparada com ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico (HCCA) a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  em ACN 50%. A segunda matriz foi preparada com a mistura de quantidades iguais de HCCA a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (em ACN e ácido fórmico 5% na proporção de 7:3) e de ácido dihidroxibenzóico (DHB) a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  (em ACN e TFA 0,1% na proporção de 7:3). A terceira matriz foi preparada com ácido sinapínico (SA) a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  também em ACN 50%.

As amostras diluídas na matriz de HCCA e na mistura de HCCA com DHB foram analisadas em modo refletor-positivo. A faixa de m/z empregada nessas análises foi de 500 a 5.000 Da. Para calibração do equipamento foi utilizada 1  $\mu\text{L}$  da solução *Peptide Mix* (Brucker Daltonics) com o mesmo volume de matriz.

As amostras diluídas em SA foram analisadas em modo linear-positivo, com detecção entre 4.000 e 100.000 Da. O equipamento foi calibrado com a solução *Protein Mix* (Brucker Daltonics), preparada da mesma forma que a solução de peptídeos.

## **SEGUNDA ETAPA – PURIFICAÇÃO E SCREENING DE ATIVIDADE BIOLÓGICA**

### **3.9 Purificação das frações de interesse (RP-HPLC)**

As frações de interesse que ainda não se encontravam puras foram novamente submetidas a RP-HPLC em diferentes colunas e a que resultou em uma melhor separação dos componentes presentes em cada amostra foi então adotada nas recromatografias subsequentes. Para a coluna Shim-pack VP-ODS, 2 x 150 mm foi adotado um fluxo de 0,3mL/min e para a coluna monolítica Onyx, CHO-7643, 4,6 x 100 mm, 1mL/min. Ambas as colunas eram previamente equilibradas com o solvente A e o gradiente usado para purificar cada fração variava de acordo com o tempo de retenção na primeira etapa cromatográfica. Ao final de cada cromatografia, a coluna era lavada com 100% de solvente B e as amostras secas sob vácuo em Speed-Vac e armazenadas a -20 °C.

### 3.10 Redução e alquilação

As frações purificadas foram dissolvidas em 100 µL de tampão desnaturante contendo Cloridato de guanidina 6,0 M, Tris-HCl 0,25 M (pH 8,6) e DTT 10mM (diluído no próprio tampão). As amostras foram incubadas durante 1h a 37°C sob atmosfera de nitrogênio e agitação constante de 300 rpm (Thermomixer comfort, Eppendorf). Em seguida adicionou-se 4 µL de 4-vinilpiridina e os tubos foram novamente incubados, também sob atmosfera de nitrogênio, com agitação constante de 300 rpm durante 1h a 37°C na ausência de luz. Após finalizada a redução e alquilação das amostras, cada fração foi dessalinizada utilizando-se coluna de fase reversa em sistema de HPLC com coluna C4 Vydac 4.6 x 150 mm, equilibrada previamente com TFA 0,1% (v/v) com fluxo de 1 mL/min. As amostras eluídas foram secas sob vácuo em Speed-Vac e armazenadas a -20 °C. Uma pequena alíquota desse material foi reservada para determinação da quantidade de cisteínas por espectrometria de massa e o restante para sequenciamento químico por degradação de Edman.

### 3.11. Determinação da quantidade de cisteínas

O número de cisteínas modificadas de cada amostra foi determinado por análise espectrométrica em função da diferença entre as massas moleculares da proteína nativa e reduzida e piridiletilada, de acordo com a seguinte fórmula:

$$Nc = \frac{M_{alq} - M_{nat}}{105}$$

onde:

Nc - Número de resíduos de cisteína modificados

M<sub>alq</sub> - Massa molecular da proteína reduzida e alquilada

M<sub>nat</sub> - Massa molecular da proteína nativa

105– Massa molecular correspondente a piridiletilação de cada cisteína.

### 3.12 Digestão trípica

Após redução, alquilação e dessalinização, as frações de interesse foram submetidas à hidrólise enzimática com tripsina para posterior realização dos experimentos de "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF). Nesta etapa, as amostras foram ressuspendidas em 195 µL de tampão bicarbonato de amônio e cloreto de cálcio

( $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  50 mM e  $\text{CaCl}_2$  2 mM, pH 8,6) e incubadas com 5  $\mu\text{L}$  de Tripsina (Promega) a 20% por 16 h a 37°C.

### **3.13 Determinação das massa moleculares das proteínas de *B. marmoratus* e análise por "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF)**

Além de determinar as massas moleculares dos componentes presentes nas frações cromatográficas oriundas do fracionamento da peçonha de *B. marmoratus*, os peptídeos resultantes da digestão trípica em solução foram submetidos à técnica conhecida como "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF) utilizando espectrômetro de massa MALDI-TOF/TOF. As amostras (1  $\mu\text{L}$ ) foram aplicadas em uma placa Anchorchip<sup>TM</sup> e, depois de secas, 0,5  $\mu\text{L}$  de matriz (HCCA a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  ou a mistura de HCCA a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$  e DHB a 20  $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ ) foram adicionados sobre cada uma das amostras. As análises foram feitas no modo refletor e a faixa m/z foi de 700 a 4000 Da. A identificação de proteínas foi realizada por meio de buscas utilizando o *software* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) contra o banco de dados não-redundante NCBI. A tolerância de erro permitida foi entre 100 e 200 ppm e alguns peptídeos foram submetidos à fragmentação por espectrometria de massa com o equipamento sendo operado no modo LIFT, o qual permite a seleção de íons específicos para fragmentação. Nesses casos, foram utilizadas as amostras plaqueadas com HCCA, uma vez que esta permite uma melhor fragmentação e a identificação também foi realizada com o *software* MASCOT ("Peptide Fragment Fingerprinting" - PFF). Para ambos os procedimentos foram considerados a piridiletilação de cisteínas e a oxidação de metioninas como modificação fixa e variável, respectivamente. Além disso, alguns dos espectros adquiridos no modo LIFT, foram sequenciados com o auxílio do *software* PepSeq (MassLynx 4.0, Micromass) em modo manual.

### **3.14. Determinação quantitativa de proteínas**

A concentração de proteínas da peçonha bruta e das frações cromatográficas foram determinadas pelo microensaio de Bradford (1976), com curva de calibração construída a partir de diluições de albumina sérica bovina (BSA). Esse método baseia-se na ligação do corante Coomassie Blue G250 às proteínas (Kruger, 2002) e é muito utilizado por se tratar de um modo rápido de estimar a concentração protéica de uma amostra.

### **3.15. Determinação da concentração inibitória mínima (CIM)**

As frações consideradas de interesse no ensaio preliminar foram acumuladas para a determinação da menor concentração capaz de inibir completamente o crescimento bacteriano. Foram realizadas determinações de CIM para as bactérias *Escherichia coli* (ATCC 25922), e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923). Aliquotas de 50 µL de cada fração pura em concentrações obtidas a partir da diluição seriada de uma solução-estoque a 300 µg/mL foram esterilizadas por filtração em filtro Millex GV 0,22 µm e incubadas com 50 µL de suspensão bacteriana, contendo de 2 a 7 x 10<sup>5</sup> CFUs, dependendo da linhagem bacteriana utilizada. Após a incubação por 22 h a 37°C, as placas foram analisadas a 595nm, em leitora BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules, CA, USA). Os ensaios foram realizados em triplicata.

### **3.16. Ensaio Antitumoral**

As frações consideradas de interesse no ensaio preliminar foram acumuladas (5 corridas cromatográficas) para a determinação da concentração de proteínas capazes de reduzir a viabilidade celular. Foram testadas as duas subfrações mais intensas de cada recromatografia. A linhagem utilizada foi a Hela, e cada fração pura foi adicionada aos poços diluídas em meio de cultura. Os ensaios foram realizados em triplicata. O grupo controle foi feito apenas com células e meio de cultura e a viabilidade celular foi determinada pela média da triplicata de cada concentração testada.

### **3.17. Avaliação da morfologia celular**

As células foram observadas em microscópio de contraste de fase invertido (UNICO, EUA) para análise de possíveis alterações morfológicas com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o *software* de aquisição Motic Images Plus 2.0.

### **3.18. Determinação da concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC<sub>50</sub>)**

Para determinar a concentração capaz de promover 50% de hemólise em eritrócitos, foi realizada uma diluição seriada das frações de interesse a partir de uma solução estoque de 300 µg e estas foram incubadas com a solução de eritrócitos seguindo o mesmo protocolo descrito anteriormente baseado em Onuma *et al.* (1999). O ensaio foi realizado em triplicata.

### **3.19. Avaliação da atividade fosfolipásica**

O ensaio foi realizado com base no método descrito por Boman e Kaletta (1957) que determina a presença de atividade fosfolipásica indireta causada pelos lisofosfatídeos formados pela ação da PLA<sub>2</sub> sobre os lipídeos da membrana plasmática das células. Primeiramente, foi preparada uma emulsão de gema de ovo a 1%, diluída em solução de NaCl 150 mM e CaCl<sub>2</sub> 10 mM. As frações cromatográficas obtidas a partir da peçonha bruta de *B. marmoratus* que apresentaram atividades biológicas de interesse foram previamente dosadas e diluídas no mesmo tampão salino. Em seguida, foram incubados 100 µL de cada fração com 50 µL da emulsão de trabalho em banho-maria a 37°C por 1 hora. Finalmente, 100 µL de solução de eritrócitos foram adicionados aos tubos e estes foram incubados a 4°C por 30min. Para a realização do controle negativo, a amostra foi substituída por tampão salino e como controle positivo, todos os reagentes foram substituídos por água Milli-Q<sup>®</sup>, com exceção das hemácias.

Os tubos foram então centrifugados a 2.000 rpm por 15 min. e 100 µL do sobrenadante foi retirado, aplicado em uma microplaca de 96 poços de fundo chato e foi realizada a leitura óptica a 540 nm. Com o uso dessa técnica, uma unidade específica de enzima pode ser determinada como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,001 Unidades de Absorbância por mg de proteína.

### **3.20. Avaliação da atividade proteolítica sobre fibrinogênio**

A atividade fibrinogenolítica foi realizada com a fração homóloga à metaloprotease (subfração 31.7) por meio de gel eletroforético conforme o método descrito por Rodrigues *et al.* (2000) com algumas modificações. Primeiramente 50 µL de fibrinogênio bovino (1,5 mg/mL em PBS) foi incubado com 10 µL da fração de interesse (500 µg/mL) a 37°C por diferentes períodos de tempo (5, 10, 20, 30, 45 e 60 min.). Decorridos os tempos de incubação, a reação foi parada com a adição de 25 µL do tampão desnaturante contendo SDS 2%; β-mercaptoetanol 5%; glicerol 10% e azul de bromofenol 0,005%. Os produtos da reação foram analisados por gel SDS-PAGE a 12% corado por 1h com 0,5% de Comassie Blue R250 em 50% (v/v) de metanol e 10% (v/v) de ácido acético em água Milli-Q<sup>®</sup>.

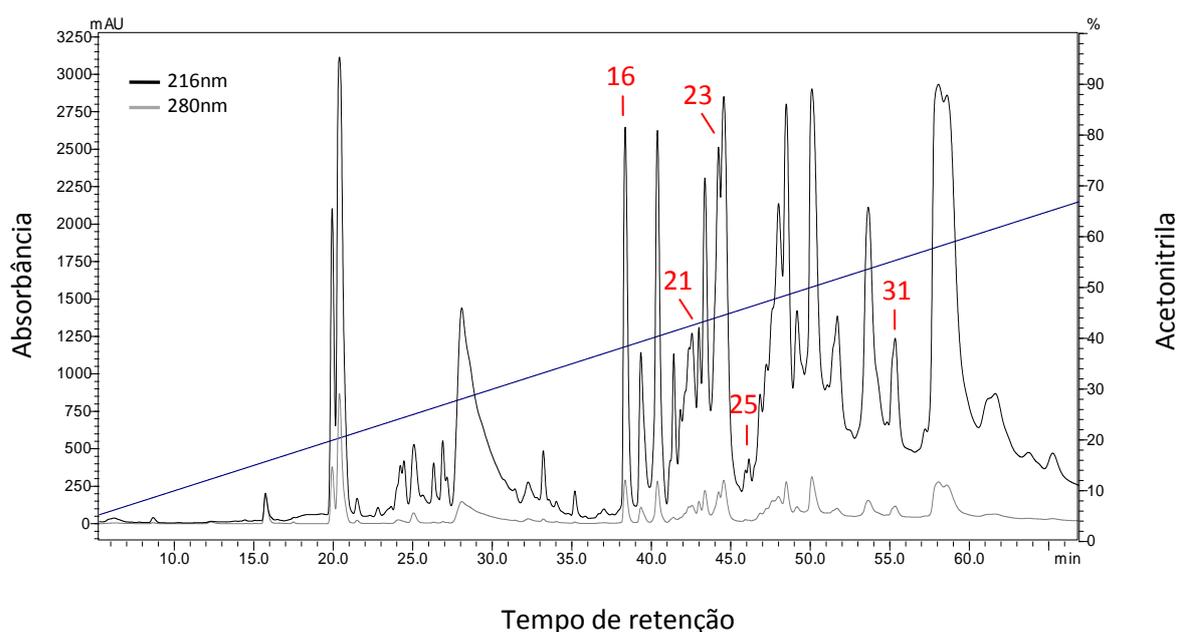
## **4. RESULTADOS**

## 4. RESULTADOS

### PRIMEIRA ETAPA – PURIFICAÇÃO E SCREENING DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

#### 4.1 Fracionamento da peçonha bruta (RP-HPLC)

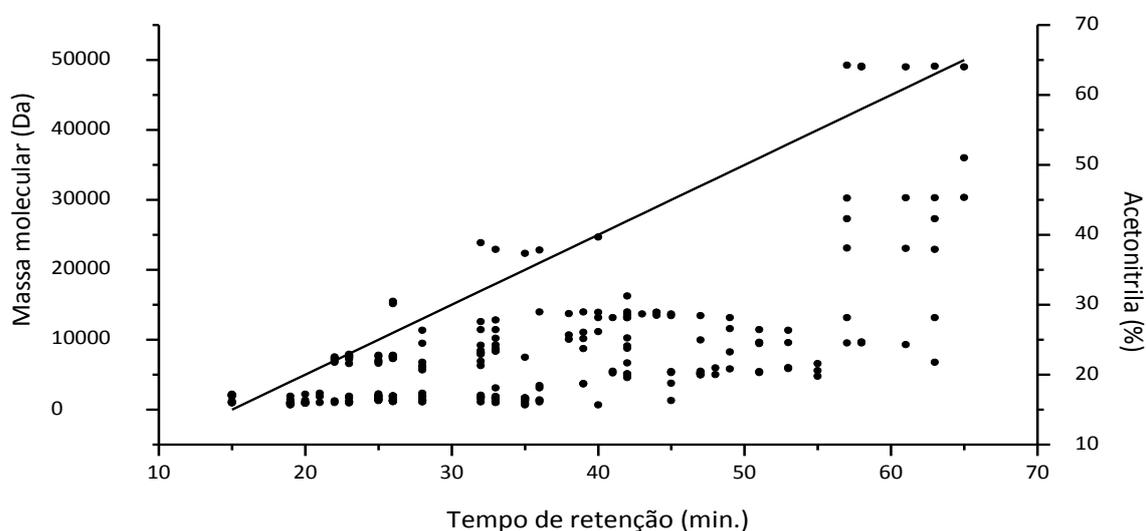
O fracionamento da peçonha bruta de *Bothropoides marmoratus* por RP-HPLC em coluna Vydac C<sub>18</sub> analítica resultou na eluição de cerca de 50 frações (Figura 7), as quais foram agrupadas em 39 tubos para facilitar a execução dos ensaios de atividade biológica e análise da composição protéica/peptídica por espectrometria de massa. Os perfis cromatográficos apresentaram ainda excelente reprodutibilidade ao longo do tempo.



**Figura 7.** Perfil cromatográfico da peçonha bruta de *B. marmoratus*. O fracionamento foi obtido a partir de HPLC em coluna de fase reversa C<sub>18</sub>. Para eluição foi empregado gradiente linear de acetonitrila com TFA 0,1% e fluxo de 1 mL/min. O monitoramento foi realizado a 216 nm e 280 nm. Os números destacados em vermelho correspondem às frações que foram recromatografadas em etapa subsequente.

## 4.2. Análise por espectrometria de massa

A análise dos componentes moleculares presentes na peçonha bruta e nas frações cromatográficas foi realizada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF usando matrizes e métodos específicos para a identificação de componentes de alta e baixa  $M_r$ . Foi possível a detecção de componentes moleculares que vão desde pouco mais de 600 Da até componentes de aproximadamente 50 kDa. A figura 8 ilustra a distribuição das massas moleculares dos componentes isolados da peçonha bruta de *B. marmoratus* por RP-HPLC em relação ao tempo de retenção, indicando a presença de componentes tanto de altas quanto de baixas massas moleculares.



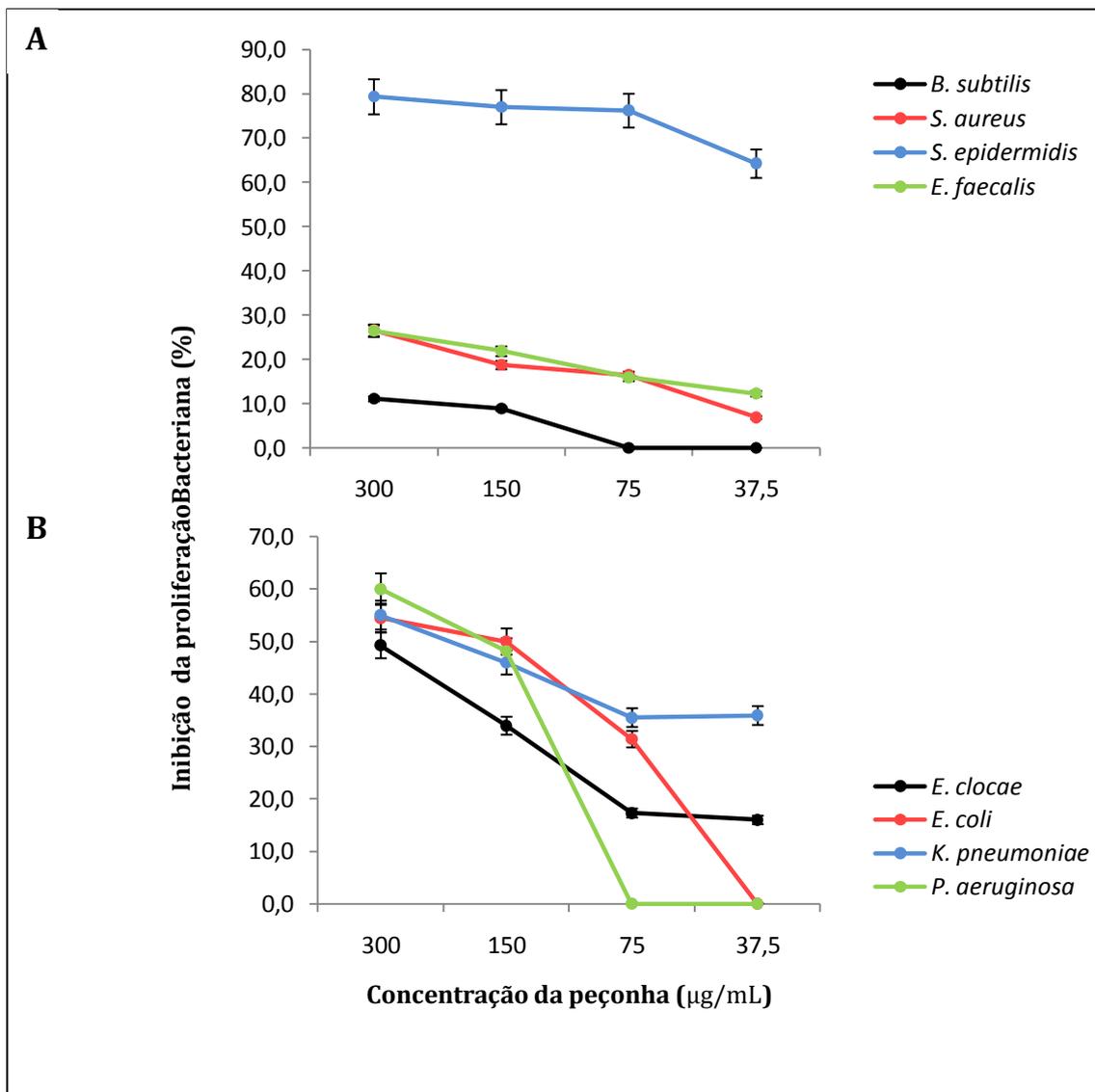
**Figura 8. Distribuição dos componentes de massas moleculares em relação à hidrofobicidade.** A linha na diagonal representa o gradiente de acetonitrila aplicado na cromatografia utilizada no fracionamento da peçonha de *B. marmoratus* em RP-HPLC.

## 4.3. Ensaios antimicrobiano e citotóxico da peçonha bruta de *B. marmoratus*

### 4.3.1. Avaliação preliminar da atividade antimicrobiana

A inibição do crescimento de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pela peçonha bruta em concentrações a partir de 300  $\mu\text{g/mL}$  foi determinada por leitura espectrofotométrica. Os resultados indicam que a peçonha bruta inibiu mais fortemente o crescimento de bactérias Gram-negativas do que o das Gram-positivas (Figura 9), com exceção de *Staphylococcus epidermidis* que, na maior concentração utilizada, teve o seu

crescimento reduzido em 79,4%. A bactéria não-patogênica *Bacillus subtilis* foi a que resistiu mais aos efeitos tóxicos da peçonha bruta, vindo a apresentar apenas 8,9% de inibição no seu crescimento na maior concentração utilizada. Vale destacar que a partir da concentração de 75  $\mu\text{g/mL}$ , o seu crescimento foi normal, não sendo detectada nenhuma inibição.

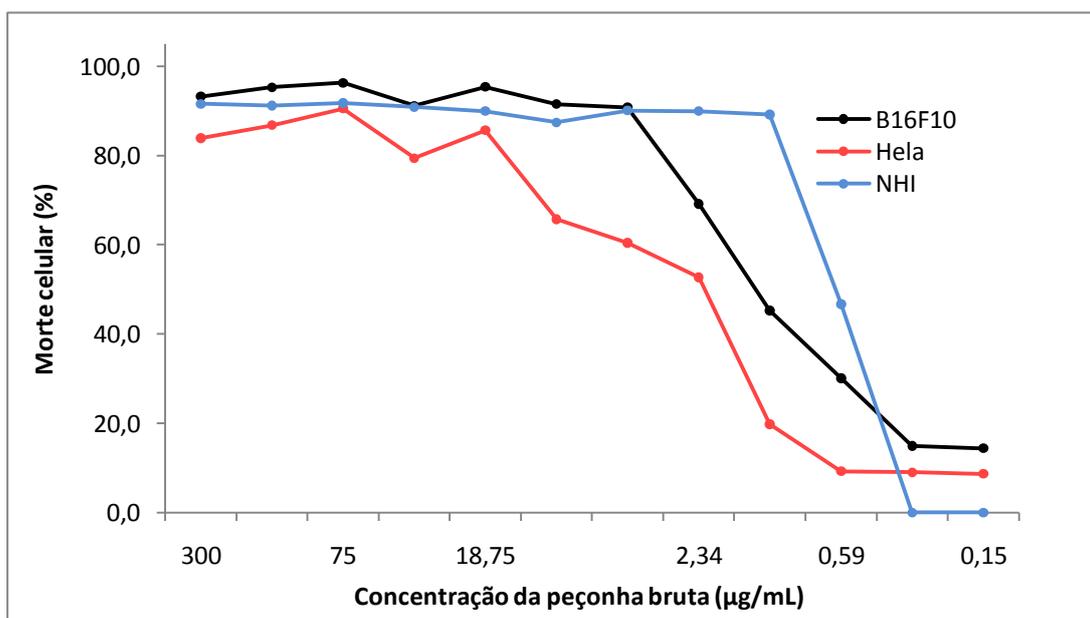


**Figura 9. Inibição da proliferação bacteriana causada pela peçonha bruta de *B. marmoratus*.** Inibição na taxa de proliferação bacteriana em resposta à incubação com doses crescentes da peçonha bruta de *Bothropoides marmoratus*. A: Bactérias Gram-positivas. B: Bactérias Gram-negativas.

Já o crescimento das bactérias Gram-negativas apresentaram os maiores níveis de inibição ficando entre 49,3% e 60% para *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. A bactéria *P. aeruginosa*, apesar de ter se mostrado bastante susceptível na concentração de 300 µg/mL, quando utilizado 75 µg/mL, a sua taxa de crescimento comparou-se ao controle.

#### 4.3.2. Avaliação preliminar da atividade citotóxica

A capacidade da peçonha bruta em inviabilizar células tumorais (B16F10, melanoma murino e HeLa, câncer de colo uterino humano) e uma linhagem normal de fibroblastos (NIH-3T3, murino) foi avaliada pelo método do MTT. Os resultados obtidos indicam que a peçonha bruta, na maior concentração utilizada, promoveu a morte celular de 95,5% das células B16F10; 83,9% das células HeLa e 93,2% de fibroblastos NIH-3T3. Tal efeito decresceu à medida que a concentração da peçonha foi sendo reduzida (Figura 10).



**Figura 10. Porcentagem de morte celular causada pela incubação das linhagens celulares com a peçonha bruta de *B. marmoratus* por 24h.** O ensaio foi realizado com células B16F10 (câncer de pele), HeLa (câncer de colo do útero) e NIH-3T3 (fibroblasto murino), de acordo com o método do MTT.

### **4.3.3. Avaliação da morfologia celular**

Após o tratamento das linhagens celulares com a peçonha bruta, os grupos controle e os grupos submetidos aos tratamentos foram analisados por microscopia de contraste de fase na maior e na menor concentração utilizadas. As imagens foram fotoregistradas e analisadas para detecção de possíveis alterações morfológicas.

Os controles de todas as linhagens usadas apresentaram morfologia bem definida, membrana citoplasmática íntegra, núcleo e nucléolos definidos (Figura 11). Foi observado que, após a incubação de 24 h, as células de todas as linhagens incubadas com a peçonha na concentração de 300 µg/mL perderam a integridade da membrana e deixaram de apresentar núcleo e nucléolos definidos. A morfologia das células foi completamente alterada e além de apresentarem volume bastante reduzido, a integridade da membrana plasmática pareceu estar comprometida. As fotomicrografias adquiridas com a menor concentração utilizada indicam que pouco ou nenhum dano ocorreu às células nessas condições. A morfologia das células ficou bem próxima à do respectivo grupo controle, com membrana aparentemente íntegra, núcleo e nucléolos bem definidos.

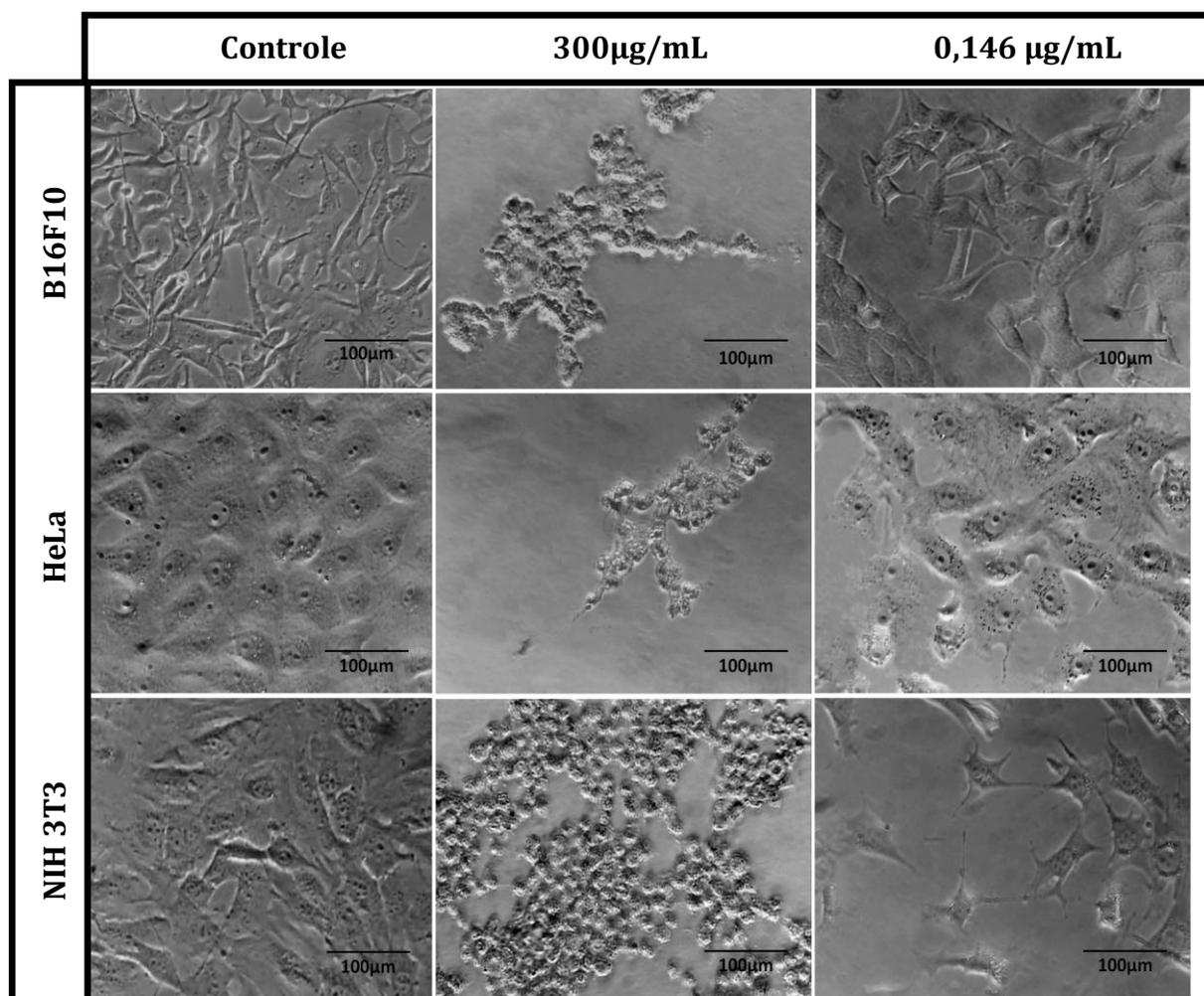
### **4.4. Avaliação da atividade antimicrobiana das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha de *B. marmoratus***

O ensaio para avaliação da atividade antimicrobiana foi realizado com todas as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta de *B. marmoratus* por RP-HPLC e para tal finalidade foram utilizadas as bactérias *S. aureus* e *E. coli*, com e sem a adição de CaCl<sub>2</sub> ao meio de cultura.

O primeiro ensaio demonstrou que as frações na concentração utilizada possuem fraca atividade contra ambas as bactérias e a maior inibição alcançada foi promovida pela fração denominada F12 com 24,7% inibição sobre *S. aureus* (tabela 2). No caso da bactéria Gram-negativa *E. coli* praticamente não houve atividade inibitória detectada, tendo sido registrado apenas 6,25% de morte causada pela fração F15, quando comparado com o grupo controle.

A utilização de CaCl<sub>2</sub> alterou um pouco a atividade de algumas frações cromatográficas. Algumas passaram a exibir atividade inibitória como as frações F2, F22, F34 e F36 com taxas de inibição de aproximadamente 19, 14, 18 e 15%, respectivamente. Por outro lado, as frações F1, F10 e F30 perderam totalmente a

atividade inibitória com a adição de  $\text{CaCl}_2$ . Outras frações tiveram sua atividade aumentada, como foi o caso da fração F19 que passou de 8 para 23% e a F20 que passou de 23 para 32%, enquanto a F12 teve a atividade reduzida de 24 para 10%, assim como a F23 que passou de 24 para 16% (tabela 2).



**Figura 11. Fotomicrografia das células submetidas ao tratamento com peçonha bruta de *B. marmoratus*.** As células foram tratadas por 24 horas em diferentes concentrações de peçonha e as fotografias adquiridas em microscópio de contraste de fase invertido (UNICO, EUA) com o uso de câmera digital acoplada a ocular do microscópio e o *software* de aquisição Motic Images Plus 2.0. De cima para baixo estão apresentadas as células B16F10, HeLa e NIH-3T3 e da esquerda para a direita o grupo controle e tratamentos a 300 µg/mL e 0,146 µg/mL.

#### 4.5. Avaliação da atividade citotóxica das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha de *B. marmoratus*

Todas as frações cromatográficas resultantes do fracionamento da peçonha bruta de *B. marmoratus* por RP-HPLC tiveram sua atividade citotóxica avaliada sobre células tumorais humanas HeLa e MCF7. Diversas frações diminuíram a viabilidade celular de ambas as linhagens, mas algumas chamaram a atenção por terem apresentado uma porcentagem de inibição maior ou por parecerem específicas para algum tipo celular (Tabela 2). As frações 16, 21, 23, 25 e 31, em virtude das atividades citotóxicas observadas (Figura 12), foram selecionadas como frações de interesse de modo a serem empregadas nas etapas subsequentes do presente trabalho. As frações 16, 23 e 31 inviabilizaram entre 22 e 47% das células estudadas e as frações 21 e 25 tiveram efeitos apenas sobre a linhagem HeLa com porcentagens de inibição de 54 e 89%, respectivamente.

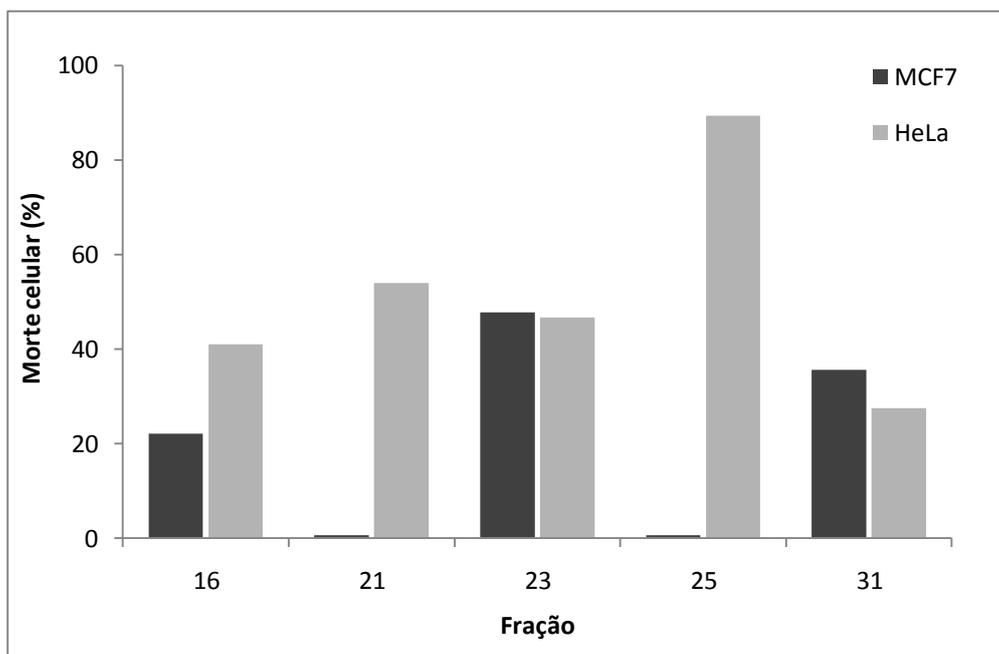


Figura 12. Porcentagem de morte celular das linhagens tumorais HeLa e MCF7 promovida pelas frações 16, 21, 23, 25 e 31.

#### 4.6. Avaliação da atividade hemolítica das frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha de *B. marmoratus*

O ensaio de atividade hemolítica realizado nessa primeira etapa utilizou as mesmas concentrações empregadas nos ensaios de citotoxicidade. As frações causaram

hemólise em torno de 10% na concentração testada, com exceção de algumas que causaram uma porcentagem maior (Tabela 2), como a F37 , 32, 23 e 24 que causaram 65,6, 45,6, 36 e 36,3%.

**Tabela 2. Comparação da atividade antimicrobiana, citotóxica e hemolítica de todas as frações cromatográficas obtidas com o fracionamento da peçonha bruta de *B. marmoratus* por RP-HPLC.** O ensaio antimicrobiano foi realizado com e sem a adição de 10 mM de CaCl<sub>2</sub>. As frações destacadas em cinza foram consideradas de maior interesse e seguiram para as demais etapas de purificação e ensaios biológicos.

Fração	Antimicrobiano (% de inibição)				Citotóxica (% de inibição)		Hemólise
	( <i>S. aureus</i> )	( <i>E. coli</i> )	( <i>S. aureus</i> ) Com CaCl <sub>2</sub>	( <i>E. coli</i> ) Com CaCl <sub>2</sub>	(MCF7)	(Hela)	(%)
1	21,50					8,5	11,5
2	0,00		19,23		14,7	2,1	10,5
3	3,74					0,6	10,1
4	3,97				5,3	10,9	9,9
5	4,67						10,2
6	4,21				4,1	5,9	11,4
7	6,07					8,3	10,4
8	8,41		8,97		15,2	8,2	10,5
9	9,35					5,6	10,6
10	9,35					14,2	13,2
11	9,81					19,2	11,6
12	24,07		10,26	6,25		16,3	12,2
13						4,2	11,2
14	6,54					5,9	15,6
15	0,23	6,25				3,4	13,9
16			1,92		22,2	41	10
17	7,48						11,4
18			13,14			2,9	8,5
19	8,64		23,40			0,5	8,1
20	23,36		32,37			36,2	14,3
21	3,74					54	11
22			14,42			31,7	22,7
23	24,77		16,67		47,8	46,7	36
24			2,88			35,6	36,3
25			12,82			89,4	11,9
26	7,48					12,3	35,3
27	1,87					12	8,6
28			13,46			11,4	27,1
29			3,21			10	22
30	10,75					21,8	19,9
31					35,7	27,5	25,3
32			5,77			14	45,6
33						13	8
34			18,59			12	8,3
35						12,7	17
36			15,71			16,3	20,5
37			0,32			19,3	65,6
38			6,73			14,3	11,4
39	-					33,8	13,1

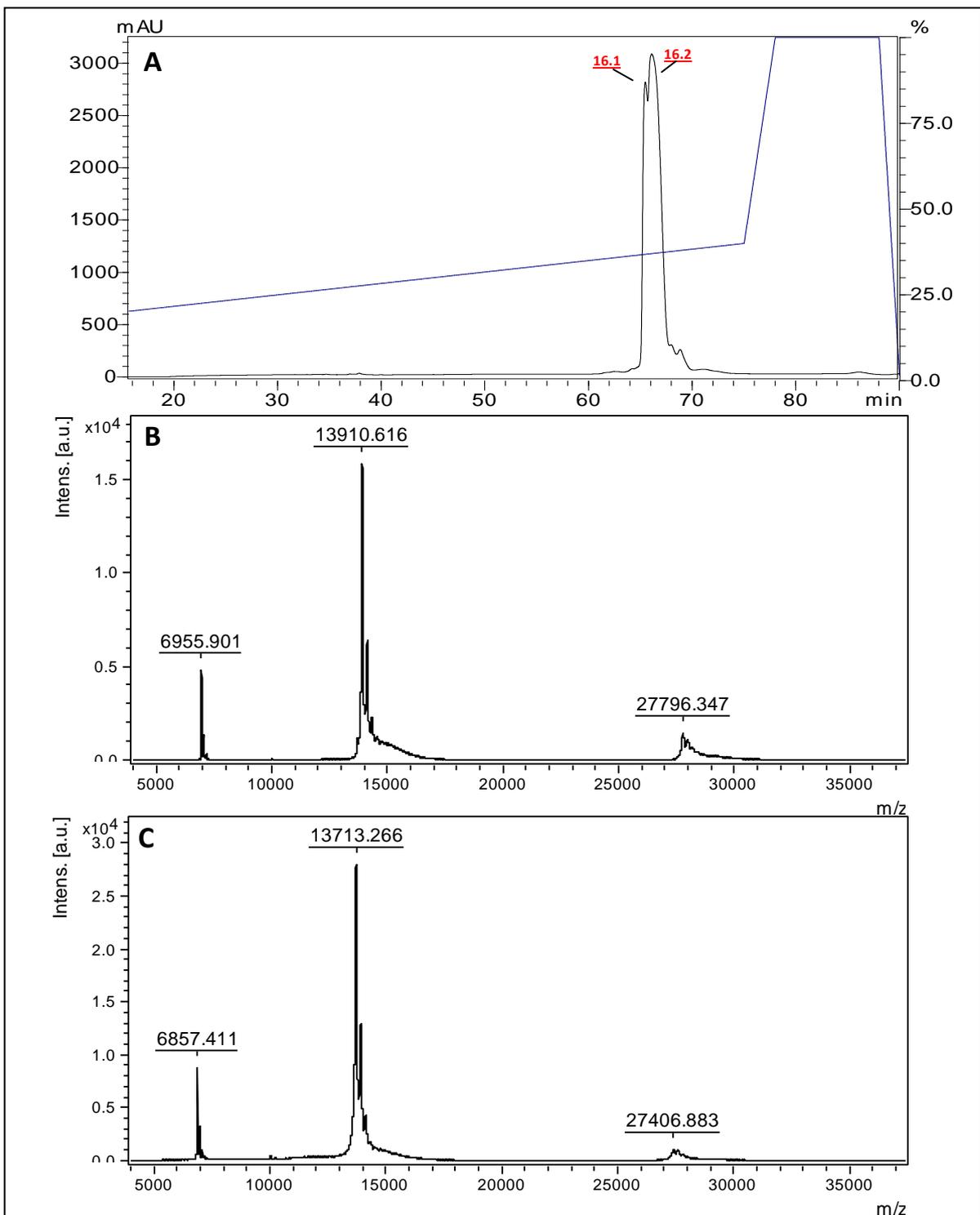
## SEGUNDA ETAPA – PURIFICAÇÃO E *SCREENING* DE ATIVIDADE BIOLÓGICA

### 4.7. Purificação das frações de interesse (RP-HPLC)

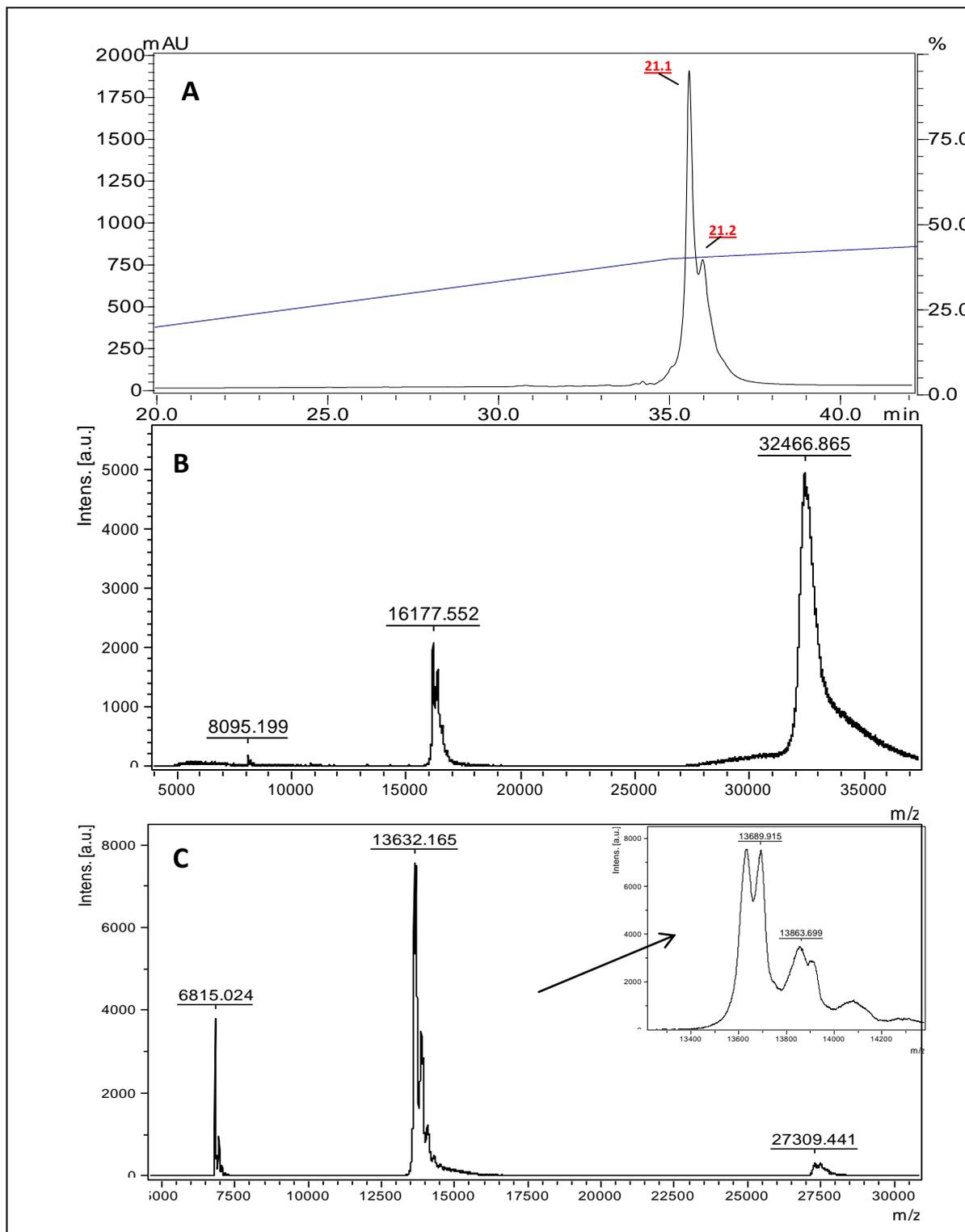
As frações de interesse foram submetidas à recromatografia para separação dos componentes moleculares presentes e só então foram analisadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF. A fração 16 foi recromatografada em diferentes colunas com o emprego de diferentes métodos (dados não mostrados) na tentativa de purificar as moléculas presentes nessa fração. A coluna na qual foram obtidos os melhores resultados foi a coluna analítica de fase reversa Shim-pack VP-ODS, 2 x 150 mm da Shimadzu, com fluxo de 0,3 mL/min.

A análise por espectrometria de massa demonstrou a eficiência da segunda cromatografia na purificação dos componentes presentes. A subfração 16.1 apresentou-se pura, com  $[M+H]^+ = 13910.6$ , além do íon duplamente carregado com  $[M+H]^{+2} = 6955.9$  e a presença de um dímero,  $[M+H]^+ = 27796.3$ , assim como a subfração 16.2, que também mostrou-se pura, com  $[M+H]^+ = 13713.2$ , íon duplamente carregado com  $[M+H]^{+2} = 6857.4$  e dímero,  $[M+H]^+ = 27406.8$  (Figura 13).

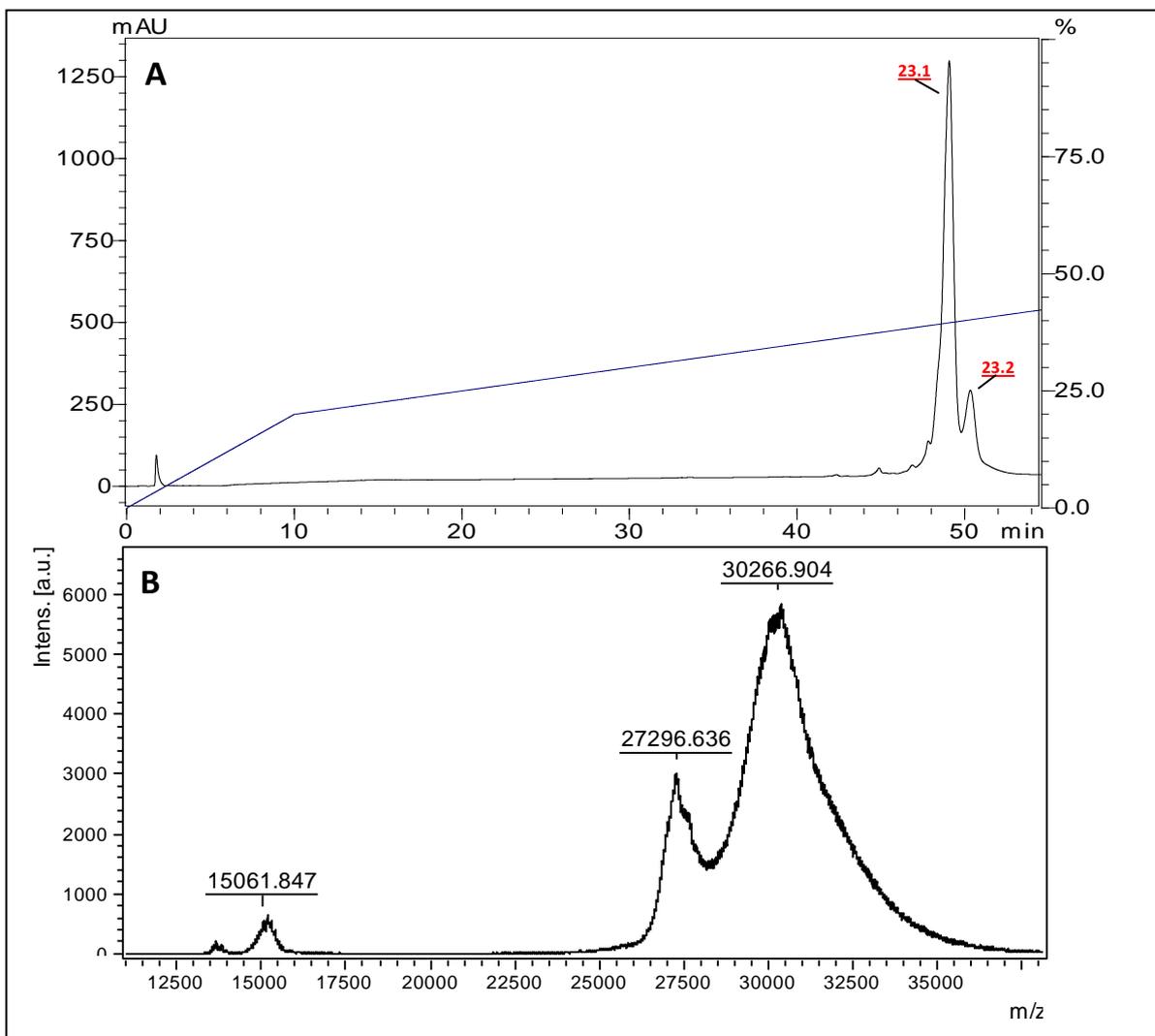
As frações 21, 23, 25 e 31 também foram recromatografadas em diferentes colunas e métodos na tentativa de separar os componentes moleculares presentes (dados não mostrados). Os melhores resultados foram obtidos com a coluna C<sub>18</sub> de fase reversa Onyx monolítica, CHO-7643, 4,6 x 100 mm com fluxo de 1 mL/min. Para cada fração foi utilizado um gradiente otimizado de acetonitrila com 0,1% de TFA e, em seguida, as frações eluídas foram analisadas por espectrometria de massa (Figuras 14, 15, 16 e 17).



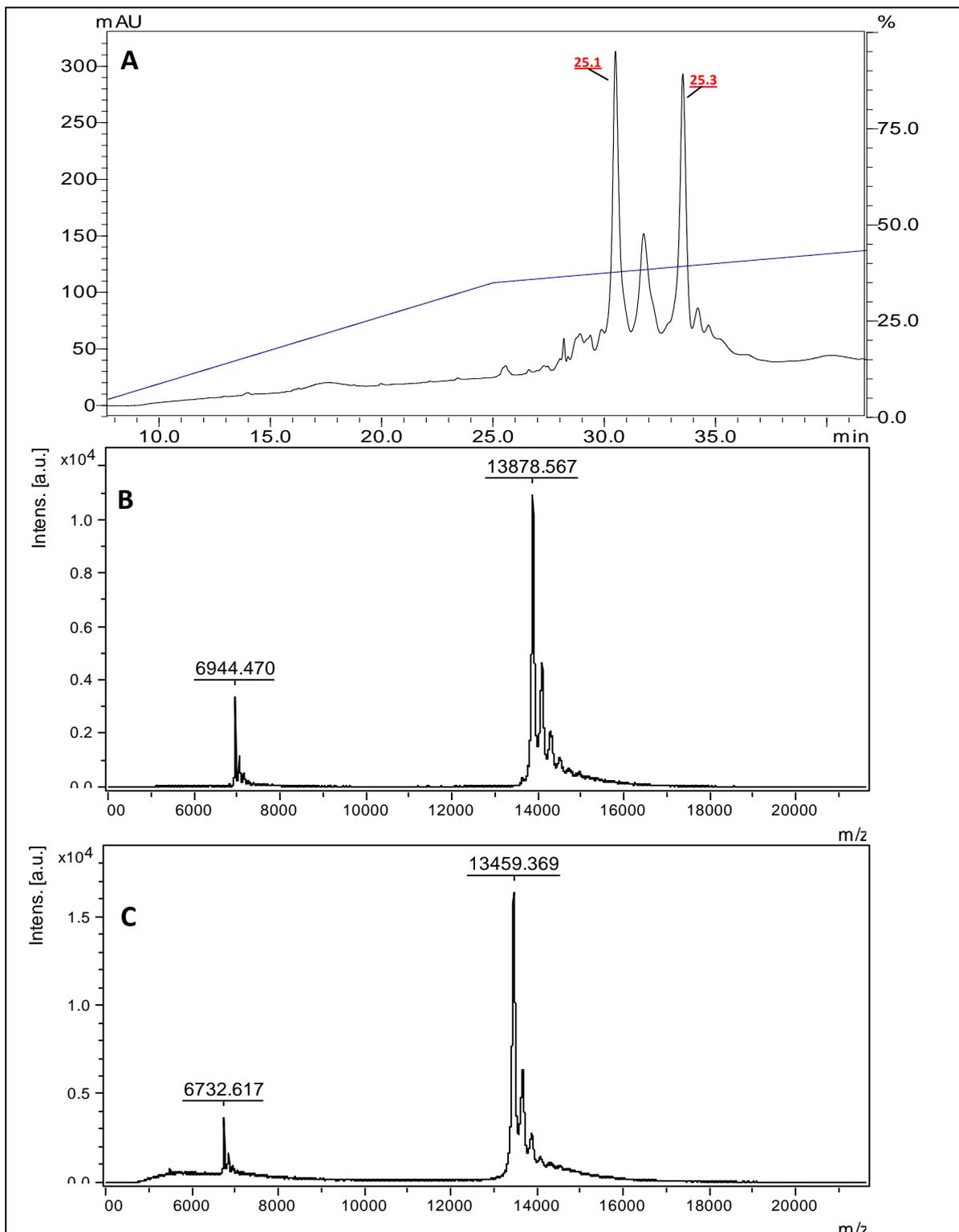
**Figura 13. Purificação dos componentes presentes na fração 16 da peçonha de *B. marmoratus* e espectrogramas das subfrações.** (A) Recromatografia da fração 16. A amostra foi aplicada em uma coluna analítica de fase reversa Shim-pack VP-ODS, com fluxo de 0,3 mL/min e gradiente de 0-40% de ACN /TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em 216 nm. Espectrogramas das subfrações 16.1 (B) com  $[M+H]^+ = 13910.6$  e 16.2 (C) com  $[M+H]^+ = 13713.2$  foram adquiridos com matriz de SA em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).



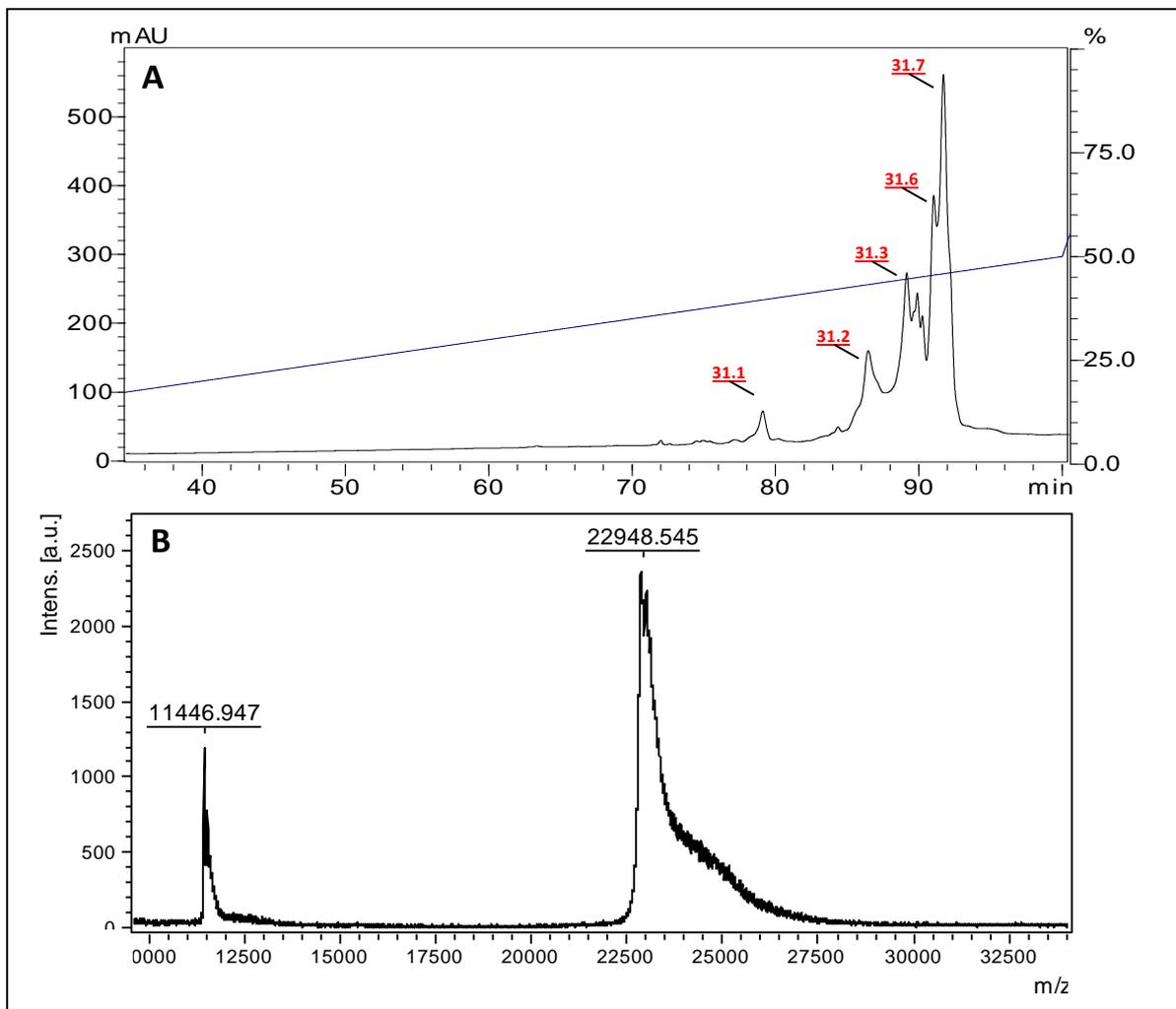
**Figura 14. Purificação dos componentes presentes na fração 21 da peçonha de *B. marmoratus* e espectrogramas das subfrações.** (A) Recromatografia da fração 21. A amostra foi aplicada em uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa, Onyx monolítica, com fluxo de 1 mL/min e gradiente de 0-50% de ACN /TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em 216 nm. Espectrogramas das subfrações 21.1 (B) com  $[M+H]^+$  = 16177.5 e 21.2 (C) com  $[M+H]^+$  = 13632.1, podendo ser detectada a presença de um contaminante com  $[M+H]^+$  = 13689.9 (inserto), foram adquiridos com matriz de SA em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).



**Figura 15. Purificação dos componentes presentes na fração 23 da peçonha de *B. marmoratus* e espectrograma da subfração 23.1.** (A) Recromatografia da fração 23. A amostra foi aplicada em uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa, Onyx monolítica, com fluxo de 1 mL/min e gradiente de 0-50% de ACN /TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em 216 nm. O espectrograma da subfração 23.1 (B) indica a presença de dois componentes moleculares com  $[M+H]^+ = 27296.6$  e  $[M+H]^+ = 30266.9$  foi adquirido com matriz de SA em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).



**Figura 16. Purificação dos componentes presentes na fração 25 da peçonha de *B. marmoratus* e espectrograma das subfrações.** (A) Recromatografia da fração 25. A amostra foi aplicada em uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa, Onyx monolítica, com fluxo de 1 mL/min. e gradiente de 0-50% de ACN /TFA 0,1%. A absorbância foi monitorada em 216 nm. Espectrogramas das subfrações 25.1 (B) com  $[M+H]^+ = 13878.5$  e 25.3 (C) com  $[M+H]^+ = 13459.3$  foram adquiridos com matriz de SA em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).



**Figura 17. Purificação dos componentes presentes na fração 31 da peçonha de *B. marmoratus* e espectrograma da subfração 31.1.** (A) Recromatografia da fração 31. A amostra foi aplicada em uma coluna C<sub>18</sub> de fase reversa, Onyx monolítica, com fluxo de 1 mL/min. e gradiente de 0-50% de ACN /TFA 0,1%. A absorvância foi monitorada em 216 nm. O espectrograma da subfração 31.7 (B) indica a presença de um componente molecular com  $[M+H]^+ = 22948.5$  e foi adquirido com matriz de SA em espectrômetro de massa do tipo MALDI-TOF/TOF Autoflex II (Bruker Daltonics, Bremen, Germany).

#### 4.8. Determinação da quantidade de resíduos de cisteína das frações de interesse

O número de resíduos de cisteínas das frações purificadas foi determinado após redução das ligações dissulfeto com cloridato de guanidina/DTT e alquilação das cisteínas com 4-vinilpiridina. A dessalinização das amostras reduzidas e alquiladas foi realizada por HPLC em coluna C<sub>4</sub> analítica (Vydac 4.6 x 150 mm) e as massas moleculares foram determinadas por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. A fração 16.1 apresentou uma diferença de massa molecular correspondente à presença de 10 resíduos de cisteínas, enquanto a 16.2 apresentou 11 cisteínas. A fração 21.1 apresentou 7 cisteínas, a fração 23.1, 13 cisteínas. A fração 31.7 foi a que apresentou a menor diferença de massa molecular e, portanto, o menor número de cisteínas, apenas 6. A massa molecular das toxinas nativas e reduzidas/alquiladas, bem como a quantidade de resíduos de cisteína estão apresentadas na Tabela 3. A quantidade de cisteínas das subfrações obtidas com as recromatografias da fração 25 não puderam ser estipuladas devido à pequena quantidade de material obtido.

**Tabela 3. Massa molecular monoisotópica e número de resíduos de cisteína das toxinas purificadas a partir da peçonha da serpente *B. marmoratus*.**

Fração	[M+H] <sup>+</sup> nativa	[M+H] <sup>+</sup> alquilada	Nº de cisteínas
16.1	13910	14929	10
16.2	13713	14939	11
21.1	16177	16948	7
23.1	30266	31650	13
31.7	22948	23624	6

#### 4.9. "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF)

Após redução, alquilação e hidrólise das subfrações mais intensas de cada recromatografia com tripsina, os digestos foram analisados por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF. A identificação de proteínas foi realizada por meio de "Peptide Mass Fingerprinting" (PMF) usando o *software* MASCOT (<http://www.matrixscience.com>) (Tabela 4).

**Tabela 4. Identificação de proteínas da peçonha de *B. marmoratus* por "Peptide Mass Fingerprinting".** A identificação das proteínas foi realizada por meio de buscas utilizando o *software* MASCOT contra o banco de dados não-redundante NCBI.

Fração	Proteína homóloga	Score	Publicação	Peptídeos encontrados	[M+H] <sup>+</sup>			
16.2	Myotoxin II precursor <sup>(1)</sup> ( <i>Bothrops moojeni</i> )	83	Protein Pept. Lett. 4, 329-334 (1997)	K.LTGCDPK.K	838.45			
				K.AVAICLR.E *	850.57			
				K.CCYKK.L	854.46			
				R.CCYVHK.C *	962.48			
				K.LTGCDPKK.D	966.55			
				R.ENLDTYNK.K	996.52			
				K.ELCECDK.A	1049.47			
				K.TIVCGENNSCLK.E	1490.63			
				K.YRYNYLKPFCCK.K	1599.73			
				K.SYGVYGCNCGVGR.G *	1629.73			
				BnSP-7 <sup>(1)</sup> ( <i>Bothrops neuwiedi pauloensis</i> )	43	Arch. Biochem. Biophys. 378 (2), 201-209 (2000)	K.SYGAYGCNCGVLGR.G *	1629.73
							R.CCYVHK.C *	962.48
							K.AVAICLR.E *	850.47
							K.CCYKK.L	854.46
		K.LTGCDPK.K	838.45					
		K.LTGCDPKK.D	966.55					
21.1	Galactose-specific lectin (BJcuL) <sup>(1)</sup> ( <i>Bothrops jararacussu</i> )	70	J. Protein Chem. 21 (1), 43-50 (2002)	K.DAEMFCR.K	976.44			
				K.DAEMFCR.K (M-ox)	992.39			
				K.DFSWEWTD.R.S	1241.52			
				K.NAFLCQCKF.-	1283.55			
				R.SCTDYLSWDK.N	1322.58			
				R.LWEDQVCESK.N	1341.58			
				K.KDFSWEWTD.R.S	1369.60			
				C-type lectin <sup>(1)</sup> ( <i>B. jararacussu</i> )	55	Biochimie 86 (3), 211-219 (2004)	K.DAEMFCR.K	976.35
							K.DFSWEWTD.R.S	1241.41
							K.KDFSWEWTD.R.S	1369.49
23.2	Serine proteinase <sup>(1)</sup> ( <i>Bothrops jararaca</i> )	51	Toxicon 46 (1), 72-83 (2005)	K.IFCPNK.K	826.36			
				K.IFCPNKK.N	954.44			
				K.EKIFCPNK.K	1083.52			
				K.TLNQDEQTR.N	1104.47			
				K.KTLNQDEQTR.N	1232.53			
				K.NDDALDKDLMLVR.L	1517.62			
				K.TNPDVPHCANINLLDDAVCR.A	2390.21			
				Thrombin-like enzyme batroxobin <sup>(2)</sup> ( <i>Bothrops atrox</i> )	70	J. Biol. Chem. 262 (7), 3132-3135 (1987)	NVITDKDIMLIR *	1430.9
				31.7	Zinc metalloproteinase BnP2 <sup>(1)</sup> ( <i>B. neuwiedi pauloensis</i> )	72	Toxicon 51 (1), 54-65 (2008)	K.TITSFGEWR.E *
R.VHEMVNTVDGFFR.S *	1550.58							
R.VHEMVNTVDGFFR.S (M-ox)	1566.56							
- .YIELAVVADHGMFTK.Y *	1693.66							
R.SMNVDASIANIEVWSK.T	1763.72							
R.SMNVDASIANIEVWSK.T (M-ox)	1779.74							

<sup>(1)</sup> - Resultado obtido por PMF

<sup>(2)</sup> - Resultado obtido por PFF

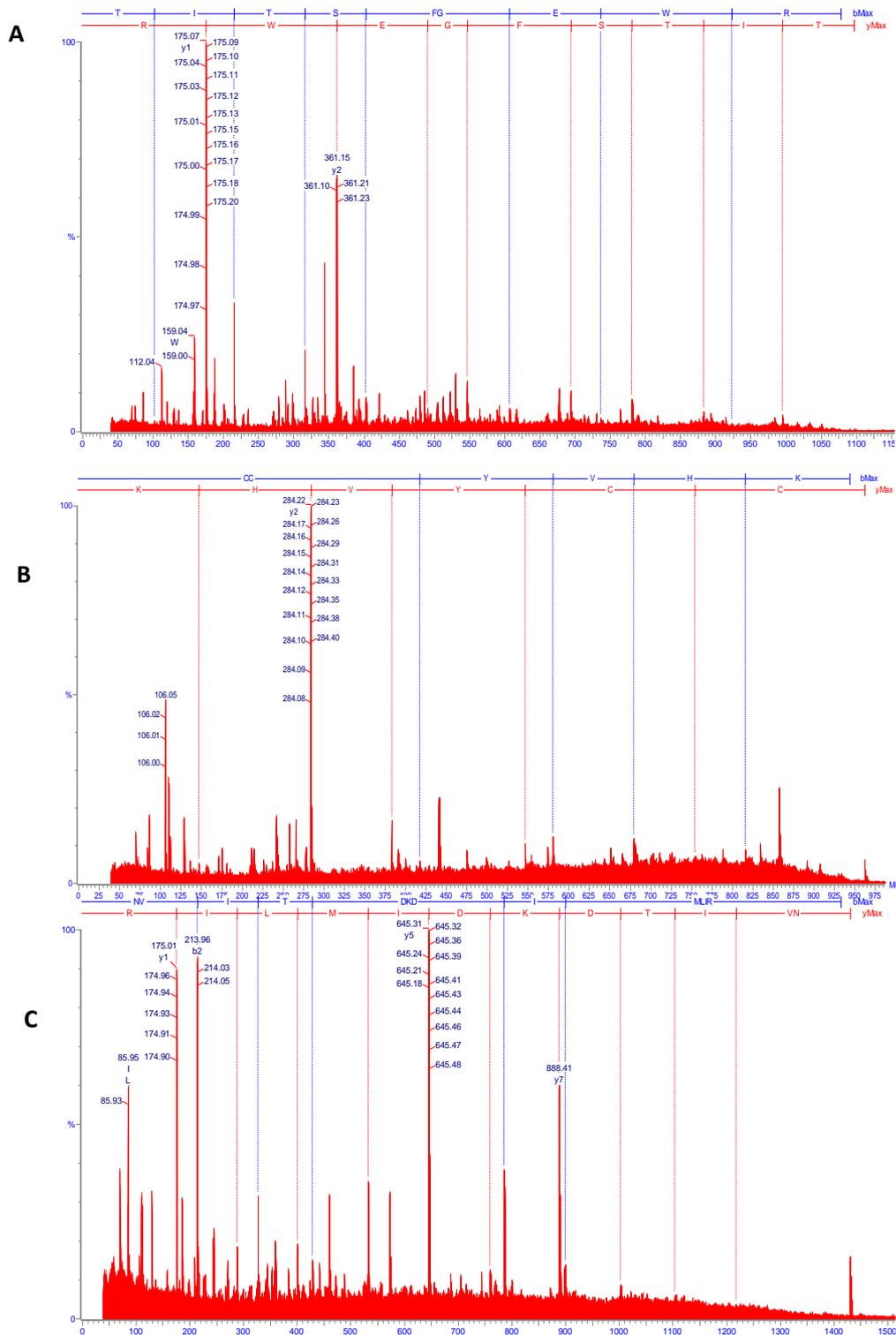
\* - Sequencia confirmada por MS/MS com sequenciamento *de novo*.

M-ox - Metionina oxidada

Cada proteína digerida gerou diversos fragmentos, os quais foram analisados por espectrometria em modo refletido, usando HCCA como matrix, e a busca por

similaridades empregando o *software* MASCOT revelou fragmentos com similaridade com outras toxinas de serpentes do mesmo gênero.

A subfração 16.2 apresentou similaridade com fosfolipases do tipo A2, com *score* significativo. Além disso, dos 10 peptídeos encontrados na amostra, três tiveram suas sequências confirmadas por sequenciamento *de novo*, utilizando o *software* Pepsec. A fração 21.1 apresentou similaridade com lectinas do tipo-C com sete peptídeos identificados e também teve *score* significativo. A fração 23.2 teve sete peptídeos encontrados por PMF com similaridade a uma serinoprotease e um peptídeo identificado por PFF com homologia a uma trombina-like, com *score* significativo e que também teve sua sequência confirmada por sequenciamento manual. Na fração 31.7 foram identificados 6 peptídeos com homologia a uma metaloprotease, dentre os quais três tiveram suas sequências confirmadas por sequenciamento *de novo*. O sequenciamento *de novo* realizado com alguns peptídeos encontra-se exemplificado na figura 18.



**Figura 18. Sequenciamento *de novo* dos peptídeos trípticos gerados pela digestão das subfrações 16.2, 23.2 e 31.7.** As seqüências foram obtidas em MALDI-TOF/TOF utilizando o modo LIFT após redução e alquilação. Os fragmentos gerados permitiram o reconhecimento completo das séries de íons y (vermelho) e b (azul). (A) Peptídeo com 962.48 Da gerado pela digestão da subfração 16.2. (B) Peptídeo com 1430.9 Da gerado pela digestão da subfração 23.2 (C) Peptídeo com 1096.61 Da gerado pela digestão da subfração 31.7.

#### 4.10. Efeitos citotóxicos das frações de interesse

Os efeitos deletérios das frações 16, 21 e 31 e de suas subfrações na viabilidade de células HeLa está apresentado na tabela 5. O tratamento realizado por 24 horas demonstrou que as subfrações 16.1 e 31.6 reduziram viabilidade celular em porcentagens maiores do que as frações brutas. De maneira diferente, a subfração 21.2 apresentou atividade reduzida comparada à fração bruta, o que pode indicar que essa fração necessite da presença de dois componentes moleculares para exercer suas atividades.

**Tabela 5. Porcentagem de morte celular causada pelo tratamento de células HeLa com as frações brutas e subfrações purificadas da peçonha de *B.marmoratus* por 24h.**

Fração Bruta	Morte (%)	Subfração	Morte (%)
16	41	16.1	97,7
		16.2	--
21	54	21.1	--
		21.2	26,6
31	27,5	31.6	94,4
		31.7	--

-- nenhuma atividade detectada.

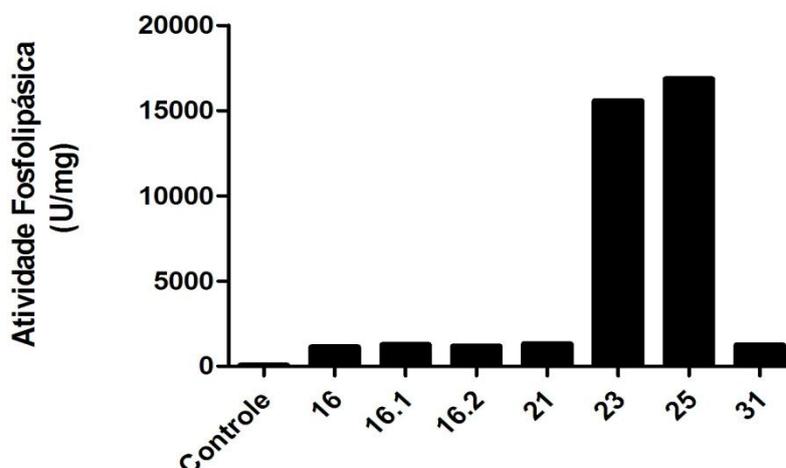
#### 4.11. Determinação da concentração capaz de promover 50% de hemólise (HC<sub>50</sub>)

Todas as frações de interesse apresentaram fraca atividade hemolítica causando menos de 8% de lise dos eritrócitos humanos na maior concentração testada de 300 µg/mL.

#### 4.12. Avaliação da atividade fosfolipásica das frações de interesse

As PLA2 são moléculas encontradas nos venenos de vários animais. Sabe-se que essas enzimas possuem um papel fundamental em vários processos fisiológicos, podem ser encontradas em vários tecidos diferentes e estão envolvidas em processos inflamatórios e em diversas doenças. A análise de algumas frações e subfrações da peçonha de *B. marmoratus* detectou a atividade de PLA2 mais intensa para as frações

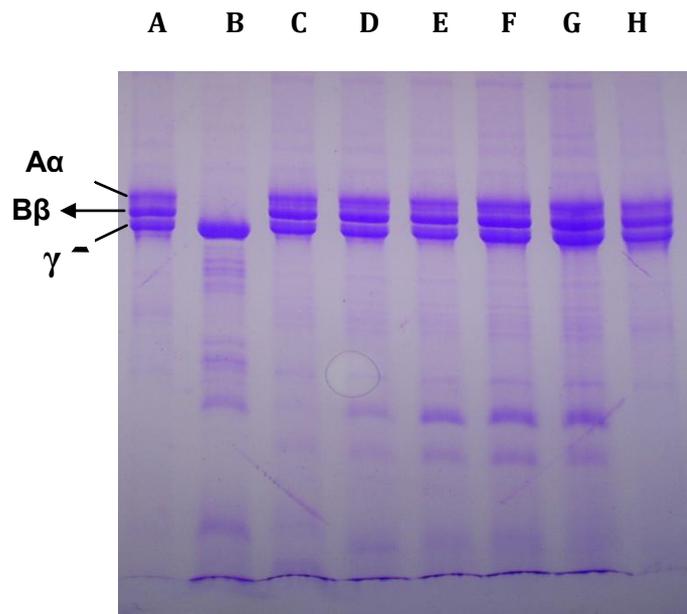
23 e 25 que apresentaram 15.577,78 e 16.861,11 unidades de enzima/mg de fração em 30 min. (Figura 18).



**Figura 19.** Determinação da atividade fosfolipásica de frações e subfrações da peçonha de *B. marmoratus*.

#### **4.13. Avaliação da atividade proteolítica sobre fibrinogênio**

O fibrinogênio é uma glicoproteína presente no plasma composta por duas subunidades idênticas que são formadas por três pares de cadeias polipeptídicas denominadas  $A\alpha$ ,  $B\beta$  e  $\gamma$ , interligadas por pontes dissulfeto. A degradação do fibrinogênio pode ser induzida por enzimas proteolíticas ou fibrinogenolíticas, especialmente metaloproteases presentes na peçonha de serpentes. Para detectar a atividade fibrinogenolítica na fração 31.7, tal fração foi incubada com fibrinogênio em diferentes tempos e os resultados indicam que essa fração não foi capaz de clivar o fibrinogênio nas condições testadas. A figura 20 evidencia que, em todos os tempos testados, as três cadeias permaneceram ligadas, como no poço controle no qual só havia o fibrinogênio.



**Figura 20. Avaliação por SDS-PAGE da atividade proteolítica sobre o fibrinogênio da subfração 31.7. (A)** Fibrinogênio mostrando as três cadeias polipeptídicas A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$ ; **(B)** (Controle) Fibrinogênio + 10  $\mu$ g de peçonha bruta de *Bothrops leucurus*; **(C)** Fibrinogênio + subfração 31.7 por 5 minutos; **(D)** Fibrinogênio + subfração 31.7 por 10 min; **(E)** Fibrinogênio + subfração 31.7 por 20 min; **(F)** Fibrinogênio + subfração 31.7 por 30 min; **(G)** Fibrinogênio + subfração 31.7 por 45 min; **(H)** Fibrinogênio + subfração 31.7 por 60 min.

## **5. DISCUSSÃO**

## 5. DISCUSSÃO

### 5.1. Fracionamento da peçonha bruta e purificação das frações (RP-HPLC)

As peçonhas de serpentes apresentam várias toxinas, responsáveis pelos diversos efeitos biológicos apresentados durante o envenenamento. Estudos têm permitido o isolamento de proteínas e peptídeos, a fim de caracterizar melhor suas atividades enzimáticas e biológicas, além de elucidar suas estruturas através dos métodos disponíveis.

A qualidade da preparação das amostras é fundamental para os estudos relacionados com a estrutura e a função das proteínas. Contaminantes podem contribuir significativamente dificultando a obtenção e interpretação dos resultados. Assim várias toxinas das peçonhas botrópicas têm sido purificadas utilizando complexas combinações de métodos cromatográficos, tais como: gel-filtração, troca iônica, RP-HPLC e cromatografias de afinidade utilizando inibidores naturais como anticorpos ou heparina (Gutierrez e Lomonte 1997, Soares *et al.* 2000, 2001, 2003, Ownby *et al.* 1999).

O fracionamento da peçonha bruta de *Bothropoides marmoratus* foi realizado por RP-HPLC em coluna Vydac C<sub>18</sub> analítica e resultou na separação de cerca de 50 frações, os perfis cromatográficos apresentaram ainda excelente reprodutibilidade, demonstrando ser este um bom método, rápido e eficiente para separação dessas proteínas.

### 5.2. Análise por espectrometria de massa

A análise dos componentes presentes na peçonha bruta e nas frações cromatográficas resultantes de seu fracionamento por RP-HPLC foi realizada por espectrometria de massa do tipo MALDI-TOF/TOF usando matrizes e métodos específicos para a identificação de componentes de alta e baixa M<sub>r</sub>, e apresentou componentes com pouco mais de 600 Da até aproximadamente 50 kDa.

As técnicas de cromatografia juntamente com a espectrometria de massa fornecem uma visão detalhada dos componentes proteicos da peçonha e a identificação desses componentes moleculares é importante, pois permite um conhecimento básico da

diversidade das substâncias presentes na peçonha desta nova espécie. No entanto, para uma melhor compreensão de como esses componentes atuam na peçonha faz-se necessário a purificação, bem como a determinação de suas estruturas primárias e de suas atividades biológicas.

### 5.3. “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF)

Os resultados obtidos por PMF permitiram a identificação, após redução, alquilação e hidrólise com tripsina de proteínas de interesse. A identificação das proteínas foi realizada por meio da técnica de “Peptide Mass Fingerprinting” (PMF) usando o *software* MASCOT.

A fração 16.2 apresentou similaridade com fosfolipases do tipo A2, e além disso, dos 10 peptídeos encontrados no digesto enzimático, três tiveram suas sequências confirmadas por sequenciamento *de novo*, utilizando o *software* Pepsec. A fração 21.1 apresentou similaridade com lectinas do tipo-C com sete peptídeos identificados e *score* significativo. A fração 23.2 teve sete peptídeos encontrados por PMF apresentando similaridade com uma serinoprotease e um peptídeo identificado por PFF com homologia a uma trombina-*like*, com *score* significativo e que também teve sua sequência confirmada por sequenciamento *de novo*. Na fração 31.7 foram identificados 6 peptídeos com homologia com uma metaloprotease, dentre os quais três tiveram suas sequências confirmadas por sequenciamento *de novo*. Portanto, baseado nos dados de análise estrutural e alinhamento dos fragmentos com *scores* significativos e confirmações por sequenciamento *de novo*, podemos sugerir que as proteínas purificadas pertencem às classes de proteínas descritas acima.

A fragmentação por MS/MS utilizando a técnica conhecida como LIFT, combinada com PMF, aumenta a taxa de identificação de proteínas (Suckau *et al.* 2003) e tem sido utilizada por outros autores para identificação de proteínas extraídas de peçonhas de serpentes (Gomes *et al.* 2011, Valente *et al.* 2009).

### 5.4. Determinação da quantidade de cisteínas

Diversos trabalhos estabeleceram a quantidade de resíduos de cisteínas conservada para os grupos de proteínas isoladas da peçonha de serpentes. As PLA2 são caracterizadas por apresentarem em sua estrutura primária 14 resíduos de cisteína envolvidos na formação de sete pontes dissulfeto. Lectinas possuem 2 cisteínas na cadeia  $\alpha$  e 6 na cadeia  $\beta$ , todas formando pontes intracadeias. As serinoproteases

possuem 12 cisteínas, formando 6 ligações dissulfeto. Metaloproteases, por sua vez, são descritas com 7 cisteínas, formando 3 pontes dissulfeto, restando um 1 resíduo de cisteína livre (Calvete *et al.* 2007, Juárez *et al.* 2004).

O número de resíduos de cisteínas das frações purificadas foi determinado, após redução das ligações dissulfeto com DTT e alquilação das cisteínas com 4-vinilpiridina. A fração 16.1, com homologia a uma PLA<sub>2</sub>, apresentou diferença de massa correspondente à presença de 10 resíduos de cisteínas, enquanto a 16.2 apresentou 11 cisteínas. A fração 21.1, homóloga a uma lectina do tipo-C, apresentou 7 cisteínas. A fração 23.1, com homologia a uma serinoprotease/trombina similar apresentou 13 cisteínas e, por fim, a fração 31.7, homóloga a uma metaloprotease foi a que apresentou o menor número de cisteínas, apenas 6.

As diferenças encontradas entre os resultados obtidos e a literatura parecem indicar uma alquilação incompleta dos resíduos de cisteína, seja devido ao tempo de incubação ou a uma redução também incompleta. Ou ainda diferenças nas massas moleculares determinadas experimentalmente podem ter interferido no cálculo final da quantidade de cisteínas devido à falta de acurácia das massas obtidas por espectrometria de massa no modo linear.

### **5.5. Avaliação da atividade antimicrobiana**

Antibióticos constituem um grupo de moléculas produzidas por diversos organismos, incluindo bactérias e fungos. No período atual, os antimicrobianos sintéticos conhecidos exibem diferentes mecanismos de ação e um amplo espectro de ação anti-bacteriano, que foram determinantes para a redução da incidência de várias infecções bacterianas.

Os principais efeitos dos antibióticos são (1) a indução da morte do agente patogênico (efeito bactericida) e/ou (2) a inibição da proliferação bacteriana (efeito bacteriostático) (Lima *et al.* 2005).

Constituintes da peçonha de espécies do gênero *Bothrops* têm demonstrado atividade antimicrobiana sobre bactérias Gram-positivas e Gram-negativas (Páramo *et al.* 1998, Barbosa *et al.* 2005). Neste estudo, foram realizados ensaios com a peçonha bruta e com as frações isoladas por RP-HPLC de maneira a determinar o potencial antimicrobiano desses diferentes constituintes.

Os resultados obtidos demonstram diferenças na resistência de cada bactéria às amostras avaliadas (tanto à peçonha bruta quanto às frações cromatográficas). A inibição na proliferação de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas pela peçonha bruta em concentrações a partir de 300 µg/mL foi determinada por leitura espectrofotométrica e os resultados indicam que a peçonha bruta inibiu mais o crescimento de bactérias Gram-negativas do que o das Gram-positivas, com exceção de *Staphylococcus epidermidis* que, na maior concentração utilizada, teve seu crescimento reduzido em 79,4%. Dentre todas as bactérias avaliadas, a bactéria Gram-positiva não-patogênica *Bacillus subtilis* foi a que menos sofreu com a presença da peçonha bruta, tendo apresentado, na maior concentração utilizada, apenas 8,9% de inibição e a partir da concentração de 75 µg/mL sua proliferação foi normal, não sendo detectada nenhuma inibição.

Já as bactérias Gram-negativas apresentaram os maiores níveis de inibição na concentração de 300 µg/mL, com taxas de 49,3% e 60% para *Enterobacter cloacae* e *Pseudomonas aeruginosa*, respectivamente. A linhagem de *P. aeruginosa*, apesar de ter tido a maior inibição na concentração de 300 µg/mL, quando utilizado 75 µg/mL, teve sua proliferação normalizada, não tendo sido detectada inibição a partir dessa concentração.

Os resultados obtidos neste trabalho e os já registrados na literatura indicam que cada peçonha pode inibir diferentemente a proliferação bacteriana e que a potência de atividade bactericida detectada nas peçonhas Botrópicas deve estar relacionada com uma combinação de fatores, e a maioria delas parece ativa contra tais microorganismos.

As diferenças de resultados nos ensaios antimicrobianos utilizando a mesma peçonha contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas provavelmente estão relacionadas às diferenças na composição da parede celular bacteriana. A parede celular bacteriana é um obstáculo a ser ultrapassado pelas proteínas. Desta maneira, há diferenças na atividade das peçonhas frente a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, devido às suas diferentes paredes celulares. Uma vez vencidas as barreiras de acesso à membrana, é necessária a interação com a superfície negativamente carregada para que estas possam atuar na camada lipídica (Yeaman & Yount 2003).

Um estudo realizado por Bustillo *et al.* (2008) mostrou atividade antimicrobiana da peçonha de *B. alternatus* contra *Escherichia coli*, *Staphylococcus aureus*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterococcus faecalis*. Contudo, a atividade foi maior

contra *E. coli* e *S. aureus* em comparação com as outras linhagens. De maneira diferente, a peçonha de *B. jararaca* e *B. jararacussu* inibiram igualmente a proliferação de cinco bactérias Gram-positivas e quatro Gram-negativas, entretanto, *E. faecalis* e *E. coli* se mostraram resistentes a ambas as peçonhas testadas (Ciscotto *et al.* 2009).

No estudo proposto por Santamaría *et al.* (2004), os efeitos antibacterianos da peçonha de *B. atrox* é devido às fosfolipases que agem de forma direta sobre as bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, concordando com Stiles *et al.* (1991), o qual sugere que a atividade antibacteriana está ligada a diversos outros componentes da peçonha.

### **5.6. Avaliação da atividade citotóxica**

O câncer é uma doença que vem aumentando suas taxas de incidência e mortalidade em todo o mundo. Atualmente, há uma busca constante por novos tratamentos e compostos anticarcinogênicos eficientes e não indutores de efeitos colaterais severos. Diversas moléculas isoladas da peçonha de serpentes vêm sendo avaliadas para esse fim (Gebrim *et al.* 2009, Rodrigues *et al.* 2009b, Carvalho *et al.* 2001).

As linhagens escolhidas para realização dos ensaios de citotoxicidade foram HeLa (câncer de colo uterino), B16F10 (câncer de pele) e NHI3T3 (fibroblasto de camundongos). Essas linhagens são muito utilizadas como modelos experimentais em diversos estudos em todo o mundo e possuem, como características marcantes, a capacidade de crescer aderidas ao substrato, não apresentam caspase-3 (Janicke *et al.* 1998) e respondem diferentemente à presença de estrógeno, tendo a linhagem MCF-7 um receptor positivo e a HeLa, um receptor negativo (Levenson & Jordan 1997, Somasekhar & Gorski 1988).

Os resultados obtidos mostram que o tratamento das células HeLa, B16F10 e NHI3T3 com a peçonha bruta em diferentes concentrações induziu redução na viabilidade celular de maneira dose dependente após 24 horas de incubação. A peçonha de *B. marmoratus* causou a morte das três linhagens testadas, todavia, nas menores concentrações foi possível notar o dano apenas às linhagens HeLa e B16F10, não sendo detectada diminuição da viabilidade celular para a linhagem normal (NHI3T3), o que sugere um mecanismo de ação diferente para as três linhagens celulares.

Diversos estudos demonstram a atividade citotóxica da peçonha bruta de várias serpentes sobre diversos tipos celulares.

Um estudo do efeito da peçonha bruta de *B. jararacussu* avaliou sua ação citotóxica sobre o crescimento de uma linhagem celular de tumor ascítico de Ehrlich (EAT) e sobre células peritoneais *in vivo* e *in vitro* (Silva *et al.* 2002). A peçonha apresentou toxicidade em todas as concentrações testadas de maneira dose dependente. O estudo comparativo *in vitro* mostrou que a taxa de viabilidade celular das células peritoneais foi significativamente maior que a de células tumorais incubadas com 2,5; 5 e 10 mg da peçonha por 3h. Porém, com 24 h de incubação foi observado um efeito inverso, onde a viabilidade das células tumorais foi maior do que a de células peritoneais em todas as concentrações.

As peçonhas de *B. alternatus* e *B. diporus* também demonstraram atividade citotóxica sobre uma linhagem celular de mioblastos em concentrações entre 1,25 e 50 µg/mL, sendo que a peçonha de *B. diporus* foi significativamente mais tóxica ( $IC_{50} = 2$  µg/mL) do que a de *B. alternatus* ( $IC_{50} = 5,8$  µg/mL) (Bustillo *et al.* 2009). Outro trabalho realizado utilizando uma linhagem de células Vero (células epiteliais de rim extraídas de um macaco africano) mostrou a citotoxicidade da peçonha de *B. neuwieddi mattogrossensis* ( $IC_{50} = 4,74$  µg/mL), *B. leucurus* ( $IC_{50} = 4,95$  µg/mL) e *B. atrox* ( $IC_{50} = 34,64$  µg/mL) (Oliveira *et al.* 2002).

As frações cromatográficas obtidas a partir do fracionamento da peçonha bruta também diminuiram a viabilidade celular de MCF7 e HeLa, sendo que algumas foram capazes de inibir o crescimento de ambas as células, enquanto outras inibiram especificamente uma ou outra linhagem celular. As frações 2 e 8, por exemplo, inibiram o crescimento de MCF7 em 14,7% e 15,2%, respectivamente, enquanto inibiram apenas 2,1% e 8,2% a proliferação de células HeLa. Por outro lado, as frações 21 e 25 inibiram o crescimento de HeLa em 54% e 89,4%, respectivamente, sem contudo inibir a viabilidade de MCF7. Os resultados indicam que cada fração exerce sua atividade de maneira diferente sobre as células e que uma mesma fração pode atuar de forma diferente em células distintas.

A redução da viabilidade celular analisada pela metabolização de MTT indica três possíveis hipóteses: ao longo do período de incubação, as frações testadas podem

induzir (1) a redução da proliferação celular, (2) a morte celular ou (3) ambos simultaneamente.

O controle da proliferação celular em células tumorais é considerado uma eficiente estratégia para prevenir ou retardar o crescimento tumoral (Molinari 2000).

Efeitos citotóxicos de toxinas de serpentes em células tumorais cultivadas *in vitro* já foram descritos na literatura. Em geral, a morte celular pode ocorrer por duas vias distintas: apoptose ou necrose. A presença de indícios de apoptose pode ser investigada por estudos histoquímicos, fragmentação do DNA, entre outros, e pode trazer informações importantes sobre o mecanismo de ação da molécula nas células.

O crescimento de oito linhagens de células tumorais foi inibido de forma dose-dependente na presença de uma lectina (BJcuL) extraída da peçonha de *B. jararacussu*. Esta lectina foi mais potente como inibidora do crescimento de linhagens de câncer renal (caki-1 e A-498) e de pâncreas (CFPAC-1) com concentração inibitória mínima de 50% (IC<sub>50</sub>) em torno de 1-2 mM. As células cancerosas de melanoma (Wm115) e próstata (PC-3) mostraram valores de IC<sub>50</sub> entre 7,9 e 8,5 mM, respectivamente, na presença da lectina BjcuL. Utilizando linhagens tumorais de câncer de cólon (Caco-2) e mama (MCF7), a lectina BJcuL não mostrou nenhum efeito, e os autores sugerem que ela possua um efetivo como inibidor do crescimento celular para algumas linhagens de células cancerosas (Pereira-Bittencourt *et al.* 1999).

Outro trabalho realizado por Daniele *et al.* (1997) demonstrou a atividade citotóxica de uma PLA2 isolada de *B. neuwiedii* (Yarará chica), classificada como P-3, e de duas isoformas, P-I e P-II. Neste trabalho, todas as isoformas apresentaram atividade citotóxica *in vitro* contra células de melanoma (B16F10) avaliadas pelo método do MTT, com um IC<sub>50</sub> de 31 µg/mL para a isoforma P-3, e de 15 µg/mL para a P-1 e P-2. A diferença observada com a inibição de enzimas sugere um mecanismo diferente para a ação citotóxica da P-3 em relação à P-1 e P-2.

### **5.7. Avaliação da morfologia celular**

Após o tratamento das células com a peçonha bruta, os grupos controle e os submetidos aos tratamentos foram analisados por microscopia de contraste de fase para visualização de modificações na morfologia celular. Os controles de todas as linhagens usadas apresentaram morfologia bem definida, membrana citoplasmática íntegra, núcleo e nucléolos definidos enquanto que, nas células tratadas por 24 h, foi observado que

após a incubação com 300 µg/mL da peçonha bruta, as células perderam a integridade da membrana e deixaram de apresentar núcleo e nucléolos definidos. O comprometimento da integridade celular ocorreu de maneira dose-dependente e as fotomicrografias adquiridas com as células tratadas com a menor concentração utilizada indicam que pouco ou nenhum dano ocorreu às células nessas condições, ficando bem próxima à do respectivo grupo controle.

### **5.8. Avaliação da atividade fosfolipásica**

As PLA<sub>2</sub> são moléculas encontradas nos venenos e peçonhas de vários animais. Sabe-se que essas enzimas possuem um papel fundamental em vários processos fisiológicos, podem ser encontradas em vários tecidos diferentes e estão envolvidas em processos inflamatórios e em várias doenças.

A análise de algumas frações e subfrações da peçonha de *B. marmoratus* detectou a atividade de PLA<sub>2</sub> mais intensa para as frações 23 e 25 que apresentaram 15.577,78 e 16.861,11 unidades de enzima/mg de fração após 30 min de incubação, enquanto a fração 16 (identificada como PLA<sub>2</sub>) não apresentou atividade catalítica.

As PLA<sub>2</sub>s símiles Lys49, com baixa ou nenhuma atividade enzimática sobre substratos artificiais, são amplamente estudadas. Apesar de não serem capazes de hidrolizar fosfolipídeos, elas apresentam outras atividades e por isso têm atraído a atenção como modelos de indução de citotoxicidade e mionecrose por um mecanismo de ação cataliticamente independente (Delatorre *et al.* 2010, Polgár *et al.* 1996).

Como exemplo de enzimas Lys-49 que possuem pouca ou nenhuma atividade catalítica, porém atividade miotóxica intensa, podemos citar as PLA<sub>2</sub> Lys-49 extraídas das peçonhas de *Bothrops asper* (MT-II), *Bothrops jararacussu* (BTX-I), *Bothrops pirajai* (PrTX-I), *Bothrops moojeni* (MjTX-I) e *Bothropoides pauloensis* (BnSP-7) (Soares & Giglio 2003).

Possivelmente as ações associadas a estas enzimas devem-se à presença de resíduos hidrofóbicos e catiônicos, próximos à região C terminal (Calderon & Lomonte 1998).

Ketelhut *et al.* (2003) isolaram quatro fosfolipases A<sub>2</sub> ácidas da peçonha de *Bothrops jararacussu* e estas apresentaram atividade miotóxica tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Este efeito observado não está correlacionado com a atividade cataáltica,

favorecendo a hipótese de que miotoxicidade é consequência de uma ação indireta das fosfolipases A<sub>2</sub>.

### **5.9. Avaliação da atividade proteolítica sobre fibrinogênio**

A atividade fibrinogenolítica da fração 31 foi analisada por SDS-PAGE, e revelou que a fração não foi capaz de degradar as cadeias do fibrinogênio. Diferentemente, outros trabalhos mostraram a atividade positiva para enzimas isoladas de outras peçonhas.

De fato, as metaloproteases são conhecidas por suas propriedades fibrinogenolíticas; todavia, os métodos utilizados para purificação dessas enzimas geralmente envolvem cromatografias de interação hidrofóbica e troca catiônica, em contraste com a metodologia utilizada na purificação dessa proteína no presente trabalho. Como essas enzimas são rapidamente inativadas pela exposição a temperatura e pH extremos, já era esperado que a atividade fibrinogenolítica não fosse detectada (Swenson & Markland Jr. 2005). De qualquer maneira, a atividade citotóxica foi mantida, o que indica a ação de mecanismos diferentes de atuação dessas enzimas.

## **6. CONCLUSÃO**

## 6. CONCLUSÃO

O estudo dos componentes de massa molecular da peçonha de *Bothropoides marmoratus* revelou a presença de cerca de 50 componentes, os quais apresentaram massas entre 600 e 50.000 Da.

A peçonha bruta de *B. marmoratus* possui atividade citotóxica contra linhagens B16F10 (câncer de pele), HeLa (câncer de colo uterino), e uma linhagem de células normais NIH-3T3 (fibroblasto murino) e também apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas em concentrações a partir de 300 µg/mL, sendo que as Gram-negativas foram mais intensamente inibidas do que as Gram-positivas.

Algumas frações cromatográficas obtidas por RP-HPLC também foram capazes de inibir o crescimento de células tumorais e de bactérias, sendo que foram encontradas diferenças de inibição tanto entre as frações quanto entre as linhagens, demonstrando a especificidade de algumas frações para determinadas células.

Estudos futuros envolvendo o sequenciamento completo das proteínas, bem como, a determinação de suas estruturas terciárias, serão necessários para se compreender as diferentes ações farmacológicas induzidas por estas enzimas. Os estudos seguintes nessa área resultarão em novas descobertas que possibilitarão uma melhor compreensão da toxicidade dessas enzimas tão versáteis podendo utilizá-las como ferramentas em várias áreas do conhecimento científico.

## **7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Abreu VA, Dal Belo CA, Hernandez-Oliveira SS, Borja-Oliveira CR, Hyslop S, Furtado Mde F, Rodrigues-Simioni L. 2007.** Neuromuscular and phospholipase activities of venoms from three subspecies of *Bothrops neuwiedi* (*B. n. goyazensis*, *B. n. paranaensis* and *B. n. diporus*). *Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol* 148: 142-149.
- Amaral A. 1925.** South American snakes in the collection of the United States National Museum. . *Proc US Nat Mus.* v. 67: 1-30.
- Andreu D, Rivas L. 1998.** Animal antimicrobial peptides: an overview. *Biopolymers* 47: 415-433.
- Andrews RK. & Berndt MC. 2000.** Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. *Toxicon*, 38, 775-91.
- Andrews RK., Kamiguti AS., Berlanga O., Leduc M., Theakston RDG., Watson SP. 2001.** The use of snake venom toxins as tools to study platelet receptor for collagen and von Willebrand factor. *Haemostasis.* 31, 155-72.
- Aragão EA. 2005.** Efeito bactericida de Fosfolipases A2-Lys49: o papel da região C-terminal na atividade de Bothropstoxina-I em membranas biológicas e artificiais. Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP. 93p.
- Atsumi G., Tajima M., Hadano A., Nakatani Y., Murakami M., Kudo I. 1998.** Fas-induced Arachidonic Acid Release Is Mediated by Ca<sup>2+</sup>-independent Phospholipase A<sub>2</sub> but Not Cytosolic Phospholipase A<sub>2</sub>, Which Undergoes Proteolytic Inactivation. *The Journal of Biological Chemistry*, 273, 13870-13877.
- Azevedo-Marques MM.,Hering Se., Cupo P. 2003.** Acidente crotálico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMSA, Haddad Júnior V. Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. Editora Sarvier, FAPESP. p.91-98.
- Baldo C, Tanjoni I, Leon IR, Batista IF, Della-Casa MS, Clissa PB, Weinlich R, Lopes-Ferreira M, Lebrun I, Amarante-Mendes GP, Rodrigues VM, Perales J, Valente RH, Moura-da-Silva AM. 2008.** BnP1, a novel P-I metalloproteinase from *Bothrops neuwiedi* venom: biological effects benchmarking relatively to jararhagin, a P-III SVMP. *Toxicon* 51: 54-65.
- Barbosa PS., Martins AM. Havt A., Toyama DO., Evangelista JS., Ferreira DP., Joazeiro PP., Beriam LO., Toyama MH., Fonteles MC. & Monteiro HS. 2005.** Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. *Toxicon*, 46 (4) : 376-386.
- Basavarajappa BS & Gowda TV. 1992.** Comparative characterization of two toxic phospholipases A<sub>2</sub> from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. *Toxicon* 30: 1227-1238.
- Bellon G.. Martiny L., ROBINET A. 2004.** Matrix metalloproteinases and matrikines in angiogenesis. *Oncology hematology*, 49: 203-220.

- Berman AE. & Kozlova NI. 2000.** Integrins: structure and functions. *Membr. Cell Biol.*, 13, 207-44.
- Bérnils RS. (org.). 2009.** Brazilian reptiles – List of species. Sociedade Brasileira de Herpetologia. Em: <http://www.sbherpetologia.org.br/>. Acessado em 22 de Janeiro de 2011.
- Bithell TC., Parekh SJ., Strong RR., 1972.** Platelet-function studies in the Bernard-Soulier syndrome, *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 201 145–160.
- Bjarnason JB. & Fox JW. 1994.** Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. *Pharmac. Ther.*, 62: 325-372.ult.
- Black RA., Rauch TC., Kozlosky CJ., Peschon JJ., Slack JL., Wolfson MF., Castner BJ., Stocking KL., Reddy P., Srinivasan S., Nelson N., Boiani N., Schooley KA., Gerhart M., Davis R., Fitzner JN., Johnson RS., Paxton RJ., March CJ. and Cerretti DP., 1997.** A metalloproteinase disintegrin that releases tumor-necrosis factor- $\alpha$  from cells. *Nature* 385: 729–732.
- Bode W., Gomis-Ruth FX., Stockler W.1993.** Astacins, serralysins,snake venom and matrix metalloproteinases exhibit identical zinc-binding environments (HEXXHXXGXXH and Met-turn) and topologies and should be grouped into a common family, the ‘metzincins’, *FEBS Lett.* 331:134–140.
- Bolaños, R. 1984.** 2. Veneno de Serpientes. Estructura química y actividades biológicas y farmacológicas. In: Universidad de Costa Rica (Ed.). Serpientes venenos y ofidismo em Centro América. San José, p.45-81.
- Bradford MM. 1976.** A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochemistr.* 72: 248-254.
- Braga MD, Martins AM, Amora DN, de Menezes DB, Toyama MH, Toyama DO, Marangoni S, Barbosa PS, de Sousa Alves R, Fonteles MC, Monteiro HS. 2006.** Purification and biological effects of C-type lectin isolated from *Bothrops insularis* venom. *Toxicon* 47: 859-867.
- Braud S., Bon C., Wisner A. 2000.** Snake venom acting on hemostasis. *Biochimie* 82:851-859.
- Bucarechi F. 1990.** Elapidic envenomatin: clinical features. *Memórias do Instituto Buntantan* 52: 33-34.
- Bush K., Jacoby GA., Medeiros AA. 1995.** A functional classification scheme for  $\beta$ -lactamases and its correlation with molecular structure. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*, 39: 1211-1233.
- Bustillo S., Leiva LC., Merino L., Acosta O, Joffé EBK., Gorodner JO. 2008.** Antimicrobial activity of *Bothrops alternatus* venom from the Northeast of Argentine. *Rev Latinoam Microbiol* Vol. 50 (3-4): 79 – 82.

- Bustillo S., Lucero H., Leiva LC., Acosta O., Kier Joffé EB., Gorodner JO. 2009.** Cytotoxicity and morphological analysis of cell death induced by *Bothrops* venoms from the northeast of Argentina. *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis* 15 (1): 28-42.
- Calderon L & Lomonte B. 1998.** Immunochemical characterization and role in toxic activities of region 115-129 of myotoxin II, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops asper* snake venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 358: 343-350
- Calvete JJ., Juarez P., Sanz L. 2007.** Snake venomomics. Strategy and applications *J. Mass Spectrom.* 42: 1405–1414.
- Carvalho DD., Schmitmeier S, Novello JAC., Marklan FS. 2001.** Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. *Toxicon* 39 : 1471-1476.
- Castro HC., Fernandes M., Zingali RB. 1999.** Identification of Bothrojaracin-like proteins in snake venoms from *Bothrops* species and *Lachesis muta*. *Toxicon* 37(10):1403-1416
- Castro HC., Silva DM., Craik C., Zingali RB. 2001.** Structural features of snake venom thrombin-like enzyme: thrombin and trypsin on a single catalytic platform? *Biochimica et Biophysica Acta* (1547): 183-195.
- CDC. 2000.** Centers for Disease Control and Prevention. *Staphylococcus aureus* with reduced susceptibility to vancomycin. *Morbidity and Mortality Weekly Report*, 48: 1165-1167.
- Chauffaille, MLLF. 2005.** A propósito da apoptose em LMC: estudos promissores. *Rev. Bras. Hematol. Hemoter.* 27(2): 81-82.
- Chijiwa T., Tokunaga E., Ikeda R., Terada K., Ogawa T., Oda-Ueda N., Hattori S., Nozaki M., Ohno M. 2006.** Discovery of novel [Arg<sup>49</sup>]phospholipase A<sub>2</sub> isozymes from *Protobothrops elegans* venom and regional evolution of Crotalinae snake venom phospholipase A<sub>2</sub> isozymes in the southwestern islands of Japan and Taiwan. *Toxicon* 48(6): 672-682.
- Chippaux JP., Williams V., White J. 1991.** Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. *Toxicon* 29: 1279-1303.
- Chung CH., Peng HC., Huang TF. 2001.** Aggretin, a C-type lectin protein, induces platelet aggregation via integrin  $\alpha$ 2b and GPIIb/IIIa in a phosphatidylinositol 3-kinase independent pathway. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 285, 689-95.
- Cidade DAP., Simão TA., Dávila AMR., Wagner G., Junqueira-de-Azevedo ILM., Ho PL., Bom C, Zingali RB., Albano RM. 2006.** *Bothrops jararaca* venom gland transcriptome: Analysis of the gene expression pattern. *Toxicon* 48(4): 437-461.
- Ciscotto P, Machado de Avila RA, Coelho EA, Oliveira J, Diniz CG, Farias LM, de Carvalho MA, Maria WS, Sanchez EF, Borges A, Chavez-Olortegui C. 2009.**

Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an l-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon* 53: 330-341.

**Clark JD, Lin L, Kriz RW, Ramesha CS, Sultaman LA, Lin AY, Milona N, Knopf JL. 1991.** A novel arachidonic acid-selective cytosolic PLA2 contains a Ca(2+)-dependent translocation domain with homology to PKC and GAP. *Cell*, 65 (6): 1043-1051.

**Clemetson KJ, Navdaev A, Dormann D, Du XY, Clemetson JM. 2001.** Multifunctional snake C-type lectins affecting platelets. *Haemostasis* 31: 148-154.

**Costa TR., Menaldo DL., Oliveira CZ., Santos-Filho NA., Teixeira SS, Nomizo A., Fuly AL., Monteiro MC., SouzaBM., Palma MS., Stábeli RG., Sampaio SV., Soares AM. 2008.** Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells . *Peptides* 29 (10): 1645-1656

**Cummings BS., Mchowat J., Schnellmann RG.. 2000.** Phospholipase A2s in Cell Injury and Death. *The Journal Of Pharmacology And Experimental Therapeutics* 294 (3): 793-799.

**Cury Y, Picolo G. 2006.** Animal toxins as analgesics--an overview. *Drug News Perspect* 19: 381-392.

**Daniele, J.J., Bianco, I.D., Delgado, C., Carrillo, D.B., Fidelio, G.D., 1997.** A new phospholipase A2 isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (yararaca chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. *Toxicon* 35: 1205–1215.

**Daniele, J.J., Bianco, I.D., Fidelio, G.D., 1995.** Kinetic and pharmacological characterization of phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedii* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* 318: 65–70.

**Davidson FF & Dennis EA. 1990.** Evolutionary relationships and implications for the regulation of phospholipase A2 from snake venom to human secreted forms. *J. Mol. Evol*, 31 (3): 228-238

**de Clerck, Y. A. 2000.** Interactions between tumor cells and stromal cells and proteolytic modification of the extracellular matrix by metalloproteinases in cancer. *Eur. J. Cancer.* 36: 1258-1268.

**de Luca M., Ward CM., Ohmori K., Andrews RK., Berndt MC. 1995.** Jararhagin and jaracetin: novel snake venom inhibitors of the integrin collagen receptor,  $\alpha 2 \beta 1$ . *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 206, 570-6.

**de Roodt AR, Litwin S, Vidal JC. 2003.** Hemorrhagic activity of *Bothrops* venoms determined by two different methods and relationship with proteolytic activity on gelatin and lethality. *Toxicon* 41: 949-958.

**Delatorre P., Rocha B.A.M. , Santi-Gadelha T. , Gadelha C.A.A. , Toyama M.H. , Cavada B.S. 2010.** Crystal structure of Bn IV in complex with myristic acid: A Lys49 myotoxic phospholipase A2 from *Bothrops neuwiedi* venom. *Biochimie* 1-6.

- Dempfle CE, Kohl R, Harenberg J, Kirschstein W, Schlauch D, Heene DL. 1990.** Coagulopathy after snake bite by *Bothrops neuwiedi*: case report and results of in vitro experiments. *Blut* 61: 369-374.
- Denmeade SR & Isaacs JT. 2005.** Programmed cell death (apoptosis) and cancer chemotherapy. *Cancer Control* 3(4):1-10.
- Du XY, Sim DS, Lee WH, Zhang Y. 2006.** Blood cells as targets of snake toxins. *Blood Cells Mol Dis* 36: 414-421.
- Du XY., Navdaev A., Clemetson JM., Magnenat E., Wells TN., Clemetson KJ. 2001.** Bilinexin, a snake C-type lectin from *Agkistrodon bilineatus* venom agglutinates platelets via GPIb and 2 1. *Thromb. Haemost.*, 86, 1277-83.
- Fenwick AM., Gutberlet JRRL., Evans JA., Parkinson CL. 2009.** Morphological and molecular evidence for phylogeny and classification of South American pitvipers, genera *Bothrops*, *Bothriopsis*, and *Bothrocophias* (Serpentes: Viperidae). *Zoological Journal of the Linnean Society*, 156: 617-640.
- Ferreira FB., Rodrigues RS., Cardoso T., Rodrigues VM. 2008.** Caracterização química, enzimática e citotóxica de uma fosfolipase A2 ácida isolada da peçonha de *Bothrops paulosensis*. XII Seminário de Iniciação Científica. UFU
- Ferreira LA, Galle A, Raida M, Schrader M, Lebrun I, Habermehl G. 1998.** Isolation: analysis and properties of three bradykinin-potentiating peptides (BPP-II, BPP-III, and BPP-V) from *Bothrops neuwiedi* venom. *J Protein Chem* 17: 285-289.
- Ferreira SH, Bartelt DC, Greene LJ. 1970.** Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. *Biochemistry* 9: 2583-2593.
- Ferreira SH. 1965.** A Bradykinin-Potentiating Factor (Bpf) Present in the Venom of *Bothrops Jararaca*. *Br J Pharmacol Chemother* 24: 163-169.
- Fontes MR, Soares AM, Rodrigues VM, Fernandes AC, Da Silva RJ, Giglio JR. 1999.** Crystallization and preliminary X-ray diffraction analysis of a myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Biochim Biophys Acta* 1432: 393-395.
- Fox WJ. & Serrano SMT. 2005.** Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M 12 reprotolysin family of metalloproteinases. *Toxicon*, 45: 969-985.
- Fox WJ. & Serrano SMT. 2008.** Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. *FEBS Journal* 275:3016–3030.
- Frere JM. 1995.**  $\beta$ -lactamases and bacterial resistance to antibiotics. *Molecular Microbiology*, 16: 385-395.
- Fujimura Y., Titani IK., Usami Y., Suzuki M, Oyama R, Matsui T., Fukui H., Mitsuhiro Sugimoto,fg and Zaverio M. Rugged. 1991.** Isolation and Chemical Characterization of Two Structurally and Functionally Distinct Forms of Botrocetin, the

Platelet Coagglutinin Isolated from the Venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*, 30 (7): 1957-196.

**Gartner TK., Stocker K., Williams DC. 1980 .** Thrombolectin: a lectin isolated from *Bothrops atrox* venom. *FEBS Lett.* 117(1):13-6.

**Gebrim LA., Marcussi S, Menaldo DL., Menezes CSR., Nomizo A., Hamaguchia A., Silveira-Lacerda EP., Homs-Brandeburgo M, Sampaio SV., Soares AM., Rodrigues VM. 2009.** Antitumor effects of snake venom chemically modified Lys49 phospholipase A2-like BthTX-I and a synthetic peptide derived from its C-terminal region. *Biologicals* 37: 222-229.

**Gomes MSR., Queiroz MR., Mamede CCN., Mendes MM., Hamaguchi A., Homs-Brandeburgo ML., Sousa MV., Aquino EN., Castro MS., Oliveira F., Rodrigues VM. 2011.** Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (*BleucMP*) from *Bothrops leucurus* snake venom. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 153(3):290-300.

**Gomes VM, Carvalho AO, Da Cunha M, Keller MN, Bloch C, Jr., Deolindo P, Alves EW. 2005.** Purification and characterization of a novel peptide with antifungal activity from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon* 45: 817-827.

**Goodman H. & Gilman's AG. 1996.** The Pharmacological Basis of Therapeutics. Ed. McGraw-Hill Companies. USA. 971.

**Gross RW, Ramanadham S, Kruszka KK, Han X, Turk J. 1993.** Rat and human pancreatic islet cells contain a calcium ion independent phospholipase A2 activity selective for hydrolysis of arachidonate which is stimulated by adenosine triphosphate and is specifically localized to islet .beta.-cells. *Biochemistry*, 32 (1): 327–336.

**Gutiérrez JM. & Lomonte B. 1997.** Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms. In: Kini RM. *Venom Phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism.* 321-352.

**Gutiérrez JM. & Rucavado A. 2000.** Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. *Biochimie*, 82: 841-850.

**Gutiérrez JM. 2002.** Comprendiendo los venenos de serpientes: 50 años de investigaciones en américa latina. *Rev. Biol. Trop.* 50: 377-394.

**Gutiérrez JM., Rucavado A., Escarlante T., Díaz C. 2005.** Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. *Toxicon*, 45:997-1077.

**Haad, SJ. 1981.** Accidentes humanos por lãs serpientes de los gêneros *Bothrops* y *Lachesis*. *Memórias do Instituto Butantan.* 44/45: 403-423.

**Hahn WC. & Weinberg RA. 2002.** Modelling the molecular circuitry of cancer. *Nature Reviews Cancer* 2, 331-341.

**Havt A., Toyama MH., Nascimento NRF., Toyama DO., Nobre ACL., Martins AMC., Barbosa PSF., Novello JC., Boschero AC., Carneiro EM., Fonteles MC.,**

**Monteiro HSA. 2005.** A new C-type animal lectin isolated from *Bothrops pirajai* is responsible for the snake venom major effects in the isolated kidney. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 37 (1): 130-141.

**Hayashi T., Shimomura H., Terasaki F., Toko H., Okabe M., Deguchi H., Hirota Y., Kitaura Y., Kawamura K. 1998.** Collagen subtypes and matrix metalloproteinase in idiopathic restrictive cardiomyopathy. *Int. J. Cardiol.* 64: 109-116.

**Hazen SL, Ford DA, Gross RW. 1991.** Activation of a Membrane-associated Phospholipase A2 during Rabbit Myocardial Ischemia Which Is Highly Selective for Plasmalogen Substrate. *The Journal of Biological Chemistry* 266(9): 5629-5633.

**Heinrikson RL, Krueger ET, Keim PS. 1977.** Amino acid sequence of phospholipase A2-alpha from the venom of *Crotalus adamanteus*. A new classification of phospholipases A2 based upon structural determinants. *J. Biol. Chem.*, 252 (14): 4913-4977.

**Hirabayashi J, Kusunoki T, Kasai K, 1991.** Complete primary structure of a galactose-specific lectin from the venom of the rattlesnake *Crotalus atrox*. Homologies with Ca<sup>2+</sup>-dependent-type lectins. *J. Biol. Chem.* 266 (4): 2320-2326.

**Hite LA., Jia LG., Bjarnason JB., Fox JW. 1994.** cDNA sequences for four snake venom metalloproteinases: structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. *Arch. Biochem. Biophys.* 308:182-191.

**Horii K., Okuda D., Morita T., Mizuno H. 2003.** Structural characterization of EMS16, an antagonist of collagen receptor (GPIIb/IIIa) from the venom of *Echis multisquamatus*. *Biochemistry*, 42, 12497-502.

**Izidoro LF, Ribeiro MC, Souza GR, Sant'Ana CD, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, Goulart LR, Belebony RO, Nomizo A, Sampaio SV, Soares AM, Rodrigues VM. 2006.** Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. *Bioorg Med Chem* 14: 7034-7043.

**Janicke RU, Sprengart ML, Wati MR, Porter AG. 1998.** Caspase-3 is required for DNA fragmentation and morphological changes associated with apoptosis. *J Biol Chem* 273: 9357-9360.

**Jones ME., Jones RN., Sader H., Verhoef J., Acar J. 1998.** Current susceptibilities of staphylococci to glycopeptides determined as part of an international resistance surveillance programme. Sentry Antimicrobial Surveillance Program. *Journal of Antimicrobial Chemotherapy*, 42 (1): 119-121.

**Jones RN. & Pfaller MA. 1998.** Bacterial Resistance: A Worldwide Problem. *Diagnostic Microbiology and Infectious Disease*, 31 (2): 379-388.

**Jones RN. 1996a.** Emergent needs for basic, educational, and surveillance of antimicrobial resistance. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 25: 153-161.

- Jones RN. 1996b.** Impact of changing pathogens and antimicrobial susceptibility patterns in the treatment of serious infections in hospitalized patients. *American Journal of Medicine*, 100 (6A): 3S-12S.
- Jorge MT., Sano-Martins IS., Tomy SC., Castro SCB., Ferrari RA., Ribeiro LA., Warrell DA. 1997.** Snakebite by the bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. *Toxicon* 35 (4): 545-554.
- Juárez P., Sanz L., Calvete JJ. 2004.** Snake venomomics: Characterization of protein families in *Sistrurus barbouri* venom by cysteine mapping, N-terminal sequencing, and tandem mass spectrometry analysis. *Proteomics* 4, 327–338.
- Junqueira, MR. 2005.** Aplicação de técnicas proteômicas na caracterização do veneno da serpente *Bothrops insularis* (Viperidae). Fundação Oswaldo Cruz (Fiocruz) Rio de Janeiro, RJ. 63p.
- Kamiguti AS., Hay CR., Zuzel M. 1996.** Inhibition of collagen-induced platelet aggregation as the result of cleavage of 2-1-integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. *Biochem. J.*, 320, 635-41.
- Kamiguti AS., Zuzel M, Theakston RD. 1998.** Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. *Braz. J. Med. Biol. Res.*, 31, 853-62.
- Kasturiratne A, Wickremasinghe AR, de Silva N, Gunawardena NK, Pathmeswaran A, Premaratna R. Savioli L, Lalloo DG, Silva J. 2008.** The Global Burden of Snakebite: A Literature Analysis and Modelling Based on Regional Estimates of Envenoming and Deaths
- Kerr JFR, Wyllie AH, Curie AR. 1972.** Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 26:239-257.
- Ketelhut DFJ., Homem de Melo M., Veronese ELG., Esmeraldino LE., Murakami MT., Arni RK., Giglio JR., Cintra ACO., Sampaio SV. 2003.** Isolation; characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from *Bothrops jararacussu* snake venom. *Biochimie*. 85:983-991.
- Kim SI, Kim KS, Kim HS, Kim DS, Jang Y, Chung KH, Park YS. 2003.** Inhibitory effect of the salmosin gene transferred by cationic liposomes on the progression of B16BL6 tumors. *Cancer Res.*, 63, 6458-62
- Kini RM. & Evans HJ. 1992.** Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. *Toxicon*, 30: 265-293.
- Kini RM. 1997.** Phospholipase A2- A Complex multifunctional Protein Puzzle. In: Kini RM (ed.) *Venom Phospholipase A2 enzymes: Structure, function and Mechanism*. John Wiley & Sons, pp. 1-28.
- Koh DC, Armugam A, Jeyaseelan K. 2006.** Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cell Mol Life Sci* 63: 3030-3041.

- Komori Y, Nikai T, Tohkai T, Sugihara H. 1999.** Primary structure and biological activity of snake venom lectin (APL) from *Agkistrodon p. piscivorus* (Eastern cottonmouth). *Toxicon* 37: 1053-1064.
- Lehman JJ, Brown KA, Ramanadham S, Turk J, Gross RW. 1993.** Arachidonic Acid Release from Aortic Smooth Muscle Cells Induced by [Ar\$]Vasopressin Is Largely Mediated by Calcium- independent Phospholipase A2. *The Journal of Biological Chemistry*, 268: 20713-20716.
- Levenson AS & Jordan VC. 1997.** MCF-7: the first hormone-responsive breast cancer cell line. *Cancer Res* 57: 3071-3078.
- Lima DC., Abreu PA, Freitas CC., Santos DO., Borges RO., Santos TC., Cabral LM., Rodrigues CR., Castro HC. 2005.** Snake Venom: Any Clue for Antibiotics and CAM? *eCAM*;2(1):39-47.
- Liu CZ. & Huang TF. 1997.** Crovidisin, a collagen-binding protein isolated from snake venom of *Crotalus viridis*, prevents platelet-collagen interaction. *Arch. Biochem. Biophys.*, 337, 291-9.
- Livermore DM. 1995.**  $\beta$ -Lactamases in laboratory and clinical resistance. *Clinical Microbiology Reviews*, 8: 557-584.
- Lomonte B., Angulo Y., Rufini S., Cho W., Giglio JR., Ohno M., Daniele JJ., Geoghegan P., Gutierrez JM. 1999a.** Comparative study of the cytolytic activity of myotoxic phospholipases A2 on mouse endothelial (tEnd) and skeletal muscle (C2C12) cells in vitro. *Toxicon*. 37:145-58.
- Lomonte B., Pizarro-Cerda J., Ângulo Y., Gorvel JP., Moreno E. 1999b .** Tyr-Trp-substituted peptide 115-129 of a Lys49 phospholipase A2 expresses enhanced membrane-damaging activities and reproduces its in vivo myotoxic effect. *Biochim Biophys Acta*. 1461:19-26.
- Machado T. 2010.** Filogenia molecular das espécies de Bothrops do grupo neuwiedi (Serpentes, Viperidae). Dissertação de Mestrado. Universidade de São Paulo (USP). São Paulo, SP. 104p.
- Mackessy PS. 2009.** Snake Venom Phospholipase A2Enzymes In: Mackessy SP, ed. *Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles* CRC Press. 528.
- Málaque CMS & França FOS. 2003.** Acidente Laquétrico. In: Cardoso JLC, França FOS, Wen FH, Málaque CMSA, Haddad Júnior V. *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. Editora Sarvier, FAPESP. p.87-90.
- Markland FS. 1998.** Snake venom and the hemostatic system, *Toxicon*, 36, 1749-800.
- Marques OAV & Sazima I. 2003.** História natural das serpentes, p. 62-71. In J. L. C. Cardoso, F. O. S. França, F. H. Wen, C. M. S. Málaque & V. Haddad Jr. (Ed.). *Animais peçonhentos no Brasil: Biologia, Clínica e Terapêutica dos acidentes*. Sarvier/Fapesp. São Paulo.468p.

- Marra AR., Pereira CA., Castelo A., Carmo Filho JR., Cal RG., Sader HS., Wey SB. 2006.** Health and economic outcomes of the detection of *Klebsiella pneumoniae*-produced extended-spectrum beta-lactamase (esbl) in a hospital with high prevalence of this infection. *International Journal Infectious Diseases*, 10 (1): 56-60.
- Masuda S., Araki S., Yamamoto T., Kaji K., Hayashi H. 1997.** Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 235, 59-63.
- Masuda S., Hayashi H., Araki S. 1998.** Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family. *Eur. J. Biochem.*, 253, 36-41.
- Matsui T., Fujimura Y., Titani K. 2000.** Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure and Molecular Enzymology*. 1477(1-2): 146-156.
- Mazzi MV., Marcussi S., Carlos GB., Stabeli RG., Franco JJ., Tieli FK., Cintra ACO., Franca SC., Soares AM., Sampaio SV. 2004.** A new hemorrhagic metalloprotease from *Bothrops jararacussu* snake venom: isolation and biochemical characterization. *Toxicon*. 44 (2):215-223.
- McIntosh JM , Ghomashchi F, Gelb MH, Dooley DJ, Stoehr SJ, Giordani AB, Naisbitt SR, Conodipine-M BMO. 1995.** A Novel Phospholipase A<sub>2</sub> Isolated from the Venom of the Marine Snail *Conus magus*. *The Journal of Biological Chemistry*. 270: 3518-3526.
- Melgarejo AR. 2003.** Serpentes peçonhentas do Brasil. Em: *Animais Peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes.* (Cardoso J.L.C., França F.O.S., Wen F.H., Málaque C.M.S. & Haddad Jr. V.). Editora Sarvier, São Paulo.
- Ministério da Saúde. 2001.** Manual de Diagnóstico e Tratamento dos Acidentes por Animais Peçonhentos *Fundação Nacional de Saúde*. 120.
- Ministério da Saúde. 2009.** Casos de acidentes por serpentes e óbitos por acidentes por serpentes. Brasil, Grandes Regiões e Unidades Federadas. 2000 a 2009. Em: [http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id\\_area=1539](http://portal.saude.gov.br/portal/saude/profissional/area.cfm?id_area=1539). Acessado em 22 de Janeiro de 2011.
- Molinari M. 2000.** Cell cycle checkpoints and their inactivation in human cancer. *Cell Proliferation*, 33: 261-274.
- Mora R, Valverde B, Diaz C, Lomonte B, Gutierrez JM. 2005.** A Lys49 phospholipase A(2) homologue from *Bothrops asper* snake venom induces proliferation, apoptosis and necrosis in a lymphoblastoid cell line. *Toxicon* 45: 651-660.
- Morita T. 2005.** Structures and functions of snake venom CLPs (C-type lectin-like proteins) with anticoagulant-, procoagulant-, and platelet-modulating activities. *Toxicon*. 45(8) 1099-1114.

- Moura-da-Silva AM, Laing GD, Paine MJI, Dennison JMTJ, Politi V, Crampton JM, Theakston RDG. 1996.** Processing of pro-tumor necrosis factor- $\alpha$  by venom metalloproteinases: A hypothesis explaining local tissue damage following snake bite. *European Journal of Immunology*. 26(9): 2000–2005.
- Moura-da-Silva AM., Della-Casa MS., David AS., Assakura MT., Butera D., Bebrun P., Shannom JD., Serrano SMT., Fox JW. 2003.** Evidence for heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. *Arch. Biochem. Biophys.*, 409: 395-401.
- Murakami M & Kudo I. 2002.** Phospholipase A2. *J Biochem* 131: 285-292.
- Nair DG, Fry BG, Alewood P, Kumar PP, Kini RM. 2007.** Antimicrobial activity of omwaprin, a new member of the waprins family of snake venom proteins. *Biochem J* 402: 93-104.
- NIC, National Cancer Institute, 2011.** What is cancer? U.S. National Institute of Health Em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/what-is-cancer>. Acessado em 02 de fevereiro de 2011.
- Oldenburg J., Ananyeva NM., Saenko EL. 2004.** Molecular basis of haemophilia A, *Haemophilia* 10. 133–139.
- Oliveira CF, Lopes DS, Mendes MM, Homs-Brandenburg MI, Hamaguchi A, de Alcântara TM, Clissa PB, Rodrigues VM. 2009.** Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedii) pauloensis* snake venom. *Toxicon* 53 (5): 560-569
- Oliveira JCR, de Oca HM, Duarte MM, Diniz CR, Fortes-Dias CL. 2002.** Toxicity of South American snake venoms measured by an *in vitro* cell culture assay. *Toxicon*. 40(3):321-5.
- Oliveira-Carvalho AN., Guimarães PR., Abreu PA., Dutra DLS., Junqueira-de-Azevedo ILM., Rodrigues CR., Ho PL., Castro HC., Zingali RB. 2008.** Identification and characterization of a new member of snake venom thrombin inhibitors from *Bothrops insularis* using a proteomic approach. *Toxicon* 51(4): 659-671
- Ouyang C., Teng C. M., Huang T F. 1992.** Characterization of snake venom components acting on blood coagulation and platelet function. *Toxicon*, 30: 945-966.
- Ownby CL., Selistre-de-Araújo HS., White SP. 1999.** Fletcher, J. E., Lysine 49 phospholipase A2 proteins, *Toxicon* 37: 411-445.
- Ozeki Y., Matsui T., Hamako J., Suzuki M., Fujimura Y., Yoshida E., Nishida S. and Titani K. 1994.** C-Type Galactoside-Binding Lectin from *Bothrops jararaca* Venom: Comparison of Its Structure and Function with Those of Botrocetin *Archives of Biochemistry and Biophysics* 308 (1) :306-310
- Pal SK, Gomes A, Dasgupta SC, Gomes A. 2002.** Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. *Indian. J. Exp. Biol.* 42: 1353-1358.

- Panini SR., Yang L., Rusinol AE., Sinensky MS., Bonventre JV., Leslie CC. 2001.** Arachidonate metabolism and the signaling pathway of induction of apoptosis by oxidized LDL/oxysterol. *The Journal of Lipid Research*, 42: 1678-1686.
- Panunto PC., Silva MA, Linardi A., Buzin MP, Melo SESFC., Mello SM, Prado-Franceschi J., Hyslop S. 2006.** Biological activities of a lectin from *Bothrops jararacussu* snake venom 47, (1): 21-31.
- Páramo L., Lomonte B., Pizarro-Cerda J., Bengoechea JA., Gorvel J., Moreno E. 1998.** Bactericidal activity of Lys49 and Asp49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom. Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* 253: 452-461.
- Pereira-Bittencourt M, de Carvalho DD, Gagliardi AR, Collins DC. 1999.** The effect of a lectin from the venom of the snake, *Bothrops jararacussu*, on tumor cell proliferation. *Anticancer Res* 19: 4023-4025.
- Perona JJ. & Craik CS. 1997.** Evolutionary Divergence of Substrate Specificity within the Chymotrypsin-like Serine Protease Fold. *The Journal of Biological Chemistry*, 272: 29987-29990.
- Petrovick P R., Marques LC., de Paula IC. 1999.** New rules for hytopharmaceutical drug registration in Brazil. *Journal of Ethnopharmacology*, 66 (1): 51-55.
- Poirel L., Collet L., Nordmann P. 2000.** Carbapenem hydrolyzing metallo- $\beta$ -lactamase from a nosocomial isolate of *Pseudomonas aeruginosa* in France. *Emerging Infectious Disease*, 6: 84-85.
- Polgár J; Magnenat EM, Peitsch MC, Wells TNC, Clemetson KJ. 1996.** Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-Mr phospholipases A2: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). *Biochem. J.* 319: 961-968
- Ponzoni M & Cornaglia-Ferraris P. 1993.** Interferon-gamma-stimulated and GTP binding-proteins-mediated phospholipase A2 activation in human neuroblasts. *Biochem J.* 294(3): 893–898.
- Rádis-Baptista G. 2005.** Integrins, Cancer and Snake Toxins (Mini-Review). *J. Venom. Anim. Toxins incl. Trop. Dis.* 11, (3): 220.
- Rajendra W, Armugam A, Jeyaseelan K. 2004.** Toxins in anti-nociception and anti-inflammation. *Toxicon* 44: 1-17.
- Ramanadham S, Gross RW, Han X, Turk J. 1993.** Inhibition of arachidonate release by secretagogue-stimulated pancreatic islets suppresses both insulin secretion and the rise in  $\beta$ -cell cytosolic calcium ion concentration. *Biochemistry* 32 (1): 337–346.
- Roberto PG., Kashima S., Marcussi S., Pereira J., Astol-Filho S., Nomizo A., Giglio JR., Fontes MRM., Soares, AM., França SC. 2004.** Cloning and Identification

of a Complete cDNA Coding for a Bactericidal and antitumoral acidic phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu* Venom. *Protein J.* 23(4): 273-285.

**Rodrigues RS, Izidoro LFM, Teixeira SS, Silveira LB, Hamaguchi A, Homs-Brandeburgo MI, Selistre-de-Araujo HS, Giglio JR, Fuly AF, Soares AM, Rodrigues RS., Izidoro LFM., de Oliveira Jr RJ., Sampaio SV., Soares AM., Rodrigues VM. 2009.** Snake Venom Phospholipases A2: A New Class of Antitumor Agents. *Protein & Peptide Letters*, 16:894-898

**Rodríguez VM., Marcussi S., Cambraiab RS., Araújo AL., Malta-Netob NR., Hamaguchia A., Ferroc EAV., Homs-Brandeburgo MI., Gigliod JR., Soares AM. 2004.** Bactericidal and neurotoxic activities of two myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops neuwiedi pauloensis* snake venom. *Toxicon*, 44 (3) 1:305-314.

**Rodrigues VM., Soares AM., Andriao-Escarso SH., Franceschi AM., Rucavado A., Gutierrez JM., Giglio JR. 2001.** Pathological alterations induced by neuwiedase, a metalloproteinase isolated from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Biochimie* 83: 471-479.

**Rodrigues VM., Soares AM., Guerra-Sa R., Rodrigues V., Fontes MR., Giglio JR. 2000.** Structural and functional characterization of neuwiedase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. *Arch Biochem Biophys* 381: 213-224.

**Rucinski B., Niewiarowski S., Holt JC., Soszka T., Knudsen KA. 1990.** Batroxostatin, an Arg-Gly-Asp-containing peptide from *Bothrops atrox*, is a potent inhibitor of platelet aggregation and cell interaction with fibronectin. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research* 1054 (3):24, 257-262.

**Sader HS. 2000.** Antimicrobial resistance in Brazil: comparison of results from two multicenter studies. *Brazilian Journal Infectious Disease*, 4 (2): 91-99.

**Sader HS., Pfaller MA., Jones RN. 1994.** The prevalence of important pathogens and the antimicrobial activity of parenteral drugs at numerous medical centers in the United States: Study of the intra-and inter-laboratory dissemination of extended spectrum  $\beta$ -lactamase producing *Enterobacteriaceae*. *Diagnostic Microbiology and Infectious Diseases*, 20: 203-208.

**Sanders KL., Malhotra A., Thorpe RS. 2006.** Combining molecular, morphological and ecological data to infer species boundaries in a cryptic tropical pitviper. *Biological Journal of the Linnean Society*, 87: 343-364.

**Santamaria C., Larios S., Angulo Y., Pizarro-Cerda J., Gorvel J., Moreno E. Lomonte B. 2005.** Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. *Toxicon*. 45 (7) 1:807-815.

**Santamaria C., Larios S., Quirós S., Pizarro-Cerda J., Gorvel J. 2004.** Bactericidal and Antiendotoxic Properties of Short Cationic Peptides derived from a Snake Venom Lys49 Phospholipase A2. *Antimicrob. Agents Chemother.* 49(4):1340-1345.

- Santos DF., Pimenta FC., Oliveira RA., Montalvão ER., Santos DB., Carmo Filho JR. 2008.** Extended-spectrum  $\beta$ -lactamases producing *Klebsiella pneumoniae* isolated in two hospitals in Goiânia/Brazil: detection, prevalence, antimicrobial susceptibility and molecular typing. *Brazilian Journal Microbiology*, 39 (4): 608-612.
- Schaloske RH. & Dennis EA. 2006.** The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta* 1761: 1246–1259
- Schwartz MA. & Ingbert DE. 1994.** Integrating with Integrins. *Molec. Biol. Cell*, 5: 389-93.
- Serrano SMT. & Maroun RC 2005.** Snake toxins and hemostasis. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. *Toxicon* 45 (8)15: 1115-1132
- Silva RJ., Silva MG., Vilela LC., Fecchio D. 2002.** Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom. *Mediators of Inflammation*, 11, 99–104.
- Silva VX & Rodrigues. M. T. 2008** Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. *Phyllomedusa* 7: 46.
- Silva, V. X. 2000.** Revisão Sistemática do Complexo *Bothrops neuwiedi* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae). 2 vols. Unpublished Ph.D. Thesis. Universidade de São Paulo, Brazil.
- Silva, V. X. 2004.** The *Bothrops neuwiedi* complex. p 410–422 in J. A. Campbell and W. W. Lamar, *The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere*. Vol. I. New York. Cornell University Press.
- Soares AM & Giglio JR. 2003.** Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties. *Toxicon* 42: 855–868.
- Soares AM, Guerra-Sa R, Borja-Oliveira CR, Rodrigues VM, Rodrigues-Simioni L, Rodrigues V, Fontes MR, Lomonte B, Gutierrez JM, Giglio JR. 2000.** Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A(2) homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. *Arch Biochem Biophys* 378: 201-209.
- Soares AM, Marcussi S, Stábeli RG, Franca SC, Giglio JR, Ward RJ, Arantes EC. 2003.** Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from *Bothrops moojeni* snake plasma. *Biochem Biophys Res Commun* 302: 193-200.
- Soares AM., Mancin AC., Cecchini AL., Arantes EC., França SC., Gutiérrez JM., Giglio JR. 2001.** Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A2 subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. *Int J Biochem Cell Biol.* 33 (9):877-888.

- Somasekhar MB & Gorski J. 1988.** An estrogen-responsive element from the 5'-flanking region of the rat prolactin gene functions in MCF-7 but not in HeLa cells. *Gene* 69: 23-28.
- Souza, J. R. F., Monteiro, R. Q., Castro, H. C., Zingali, R. B. 2001.** Proteolytic action of *Bothrops jararaca* venom upon its own constituents, *Toxicon* (39): 787-792.
- Stábeli RG, Sant'Ana CD, Ribeiro PH, Costa TR, Ticli FK, Pires MG, Nomizo A, Albuquerque S, Malta-Neto NR, Marins M, Sampaio SV, Soares AM. 2007.** Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. *Int J Biol Macromol* 41: 132-140.
- Stábeli RG., Amui SF., Sant'Ana CD., Pires MG., Nomizo A., Monteiro MC, Romão PRT., Guerra-Sá R., Vieira CA., Giglio JR., Fontes MRM., Soares AM. 2006.** *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. *Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology* 142 (3-4): 371-381.
- Stiles BG., Sexton FW., Weinstein SA. 1991.** Antibacterial effects of different snake venoms: Purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon*, 29 (9): 1129-1141.
- Stocker K. 1999.** Use of snake venom proteins in medicine. *Schweiz Med Wochenschr* 129: 205-216.
- Suckau DR., Schuerenberg A., Schuerenberg M. 2003.** A novel MALDI LIFT-TOF/TOF mass spectrometer for proteomics, *Anal Bioanal Chem* 376: 952-965.
- Swenson S. & Markland Jr FS. 2005.** Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. *Toxicon* 45(8 -15):1021-1039.
- Tan NH & Ponnudurai G. 1991.** A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American lance-headed viper). *Comp Biochem Physiol B* 100: 361-365.
- Tang CH., Yang RS., Liu CZ., Huang TF., Fu WM. 2004.** Differential susceptibility of osteosarcoma cells and primary osteoblasts to cell detachment caused by snake venom metalloproteinase protein. *Toxicon*, 43, 11-20.
- Tonismagi K, Samel M, Trummal K, Ronnholm G, Siigur J, Kalkkinen N, Siigur E. 2006.** L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. *Toxicon* 48: 227-237.
- Tortora GJ., Funke BR., Case CL. 2005.** Microbiologia. Ed. Artmed. Porto Alegre, RS. 894 p.
- Toyama MH., Garcia de Oliveira D., Beriam LOS., Camillo Novello J., Rodrigues-Simioni L., Marangoni S. 2003.** Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Toxicon*. 41:1033-1038.
- Travers K. & Barza M. 2002.** Morbidity of infections caused by antimicrobial-resistant bacteria. *Clinical Infectious Diseases*, 34 (3): 131-134.

- Usami Y., Fujimura Y., Miura S., Shima H., Yoshida E., Yoshioka A., Hirano K., Suzuki M. and Titani K. 1994.** A 28-kDa Protein with Disintegrin-like Structure (Jararhagin-C) Purified from *Bothrops jararaca* Venom Inhibits Collagen- and ADP Induced Platelet Aggregation. *Biochemical and Biophysical Research Communications*. 201 (1):331-339.
- Ust WL., Carper SW., Plopper GE. 2002.** The promise of integrins as effective targets for anticancer agents. *J. Biomed. Biotechnol.*, 2, 124-30.
- Valente RH., Guimarães PR., Junqueira M., Neves-Ferreira AGC., Soares MR., Chapeaurouge A., Trugilho MRO., León IR., Rocha SLG., Oliveira-Carvalho AL., Wermelinger LS., Dutra DLS., Leão LI., Junqueira-de-Azevedo ILM., Ho PL., Zingali RB., Perales J., Domont GB. 2009.** *Bothrops insularis* venomics: A proteomic analysis supported by transcriptomic-generated sequence data. *Journal of Proteomics* 72(2- 6): 241-255.
- Vital-Brasil O. 1980.** Venenos ofídicos neurotóxicos. *Revista da Associação Médica Brasileira*, 26: 212-218.
- Vital-Brasil O. 1987.** Coral snake venoms: mode of action and pathophysiology of experimental envenomation. *Instituto de Medicina Tropical São Paulo*. 29: 119-126.
- Wang R., Kini RM., Chung MC. 1999.** Rhodocetin, a novel platelet aggregation inhibitor from the venom of *Calloselasma rhodostoma* (Malayan pit viper): synergistic and noncovalent interaction between its subunits. *Biochemistry*, 38, 7584-93.
- Weis WI, Kahn R, Fourme R, Drickamer K, Hendrickson WA. 1991.** Structure of the calcium-dependent lectin domain from a rat mannose-binding protein determined by MAD phasing. *Science* 254 (5038): 1608–1615.
- Wenson S., Costa F., Minea R., Sherwin RP., Ernst W., Fujii G, Yang D, Markland FS JR. 2004.** Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. *Mol. Cancer Ther.* 3, 499-511.
- Wüster W., Duarte R.D., Salomão M.G. 2005.** Morphological correlates of incipient arboreality and ornithophagy in island pitvipers, and the phylogenetic positions of *Bothrops insularis*. *J. Zool. Lond.*, 266: 1-10.
- Xu XL., Liu XH., Wu B., Liu WQ., Xie YS., Liu QL. 2004.** Metal-ion-and pH-induced conformational changes on acutolysin D from *Agkistrodon acutus* venom probed by fluorescent spectroscopy. *Biopolymers*, 74: 336-344.
- Yeaman MR. & Yount NY. 2003.** Mechanisms of antimicrobial peptides action and resistance. *Pharmacological Reviews*, 55: 27 – 55.
- Zingali RB., Jandrot-Perrus M., Guillin MC, Bom C. 1993.** Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: Characterization and mechanism of thrombin inhibition. *Biochemistry*, 32 (40):10794–10802.