



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"  
Campus de São José do Rio Preto

Carolina Wilson

Purificação e caracterização parcial de proteínas presentes no  
veneno de *Bothrops leucurus*

São José do Rio Preto  
2013

Carolina Wilson

Purificação e caracterização parcial de proteínas presentes no  
veneno de *Bothrops leucurus*

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Microbiologia, junto ao Programa de Pós-Graduação em Microbiologia, Área de Concentração - Biologia Molecular, do Instituto de Biociências, Letras e Ciências Exatas da Universidade Estadual Paulista "Júlio de Mesquita Filho", Campus de São José do Rio Preto.

Orientador: Prof. Dr. Raghuvir  
Krishnaswamy Arni

São José do Rio Preto  
2013

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus que me deu, principalmente, muita paciência nessa caminhada e força para a conclusão de mais uma etapa em minha vida.

Agradeço aos meus familiares que sempre me apoiaram em todos os sentidos.

Agradeço à amiga Hévila Brognaro dos Santos que me deu grande incentivo e “puxões de orelha”.

Aos amigos Flavio dos anjos e Manuel Barrionuevo que me ajudaram a “abrir os olhos” para muitas questões pessoais, acadêmicas e para os “budas” que participaram ferrenhamente desses processos!

Às amigas Drieli Rosalino e Gabrielle Pereira que estiveram comigo nos momentos difíceis dessa jornada.

Agradeço ao meu orientador, Prof. Dr. Raghuvir Krishnaswamy Arni que me deu a oportunidade de realizar o projeto em seu laboratório, pela paciência e por dividir um pouco do seu conhecimento.

Obrigada ao colega de laboratório Anwar Ullah, que me ajudou com os processos de purificação, juntamente com Ricardo Mariutti, Vinícius Santana e Rana Massod.

Agradeço também à Profa. Dra. Mara Nogueira e ao seu aluno de doutorado, Tiago Casella pelo auxílio prestado na realização dos testes com os microrganismos.

*“Nada vai te bater mais forte do que a vida.  
Não importa se você ganha ou perde, o que  
importa são quantas vezes você consegue  
apanhar e continuar de pé.”*

Rocky Balboa

## Sumário

<b>Lista de Figuras</b> .....	3
<b>Lista de Tabelas</b> .....	5
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b> .....	6
<b>RESUMO</b> .....	7
<b>ABSTRACT</b> .....	8
<b>1. INTRODUÇÃO</b> .....	9
<b>1.1. Venenos de Serpentes</b> .....	12
<i>1.1.1. Fosfolipases</i> .....	13
<i>1.1.2. L-aminoácido oxidases</i> .....	15
<i>1.1.3. Proteinases</i> .....	16
<i>Metalo proteinases</i> .....	16
<i>Serino proteinases</i> .....	17
<i>1.1.4. Utilização dos venenos de serpentes em biotecnologia e produção de fármacos</i> 18	
<b>2. OBJETIVOS</b> .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS</b> .....	22
<b>3.1. Preparação do veneno bruto</b> .....	22
<i>3.1.1. Material</i> .....	22
<i>3.1.2. Método</i> .....	22
<b>3.2. Separação inicial – Cromatografia de exclusão molecular</b> .....	22
<i>3.2.1. Material</i> .....	23
<i>3.2.2. Método</i> .....	23
<b>3.3. Ensaio de purificação da fração PI da exclusão molecular</b> .....	23
<i>3.3.1. Material</i> .....	24
<i>3.3.2. Método</i> .....	24
<b>3.4. Ensaio de purificação da fração PII da exclusão molecular</b> .....	25
<i>3.4.1. Material</i> .....	25
<i>3.4.2. Método</i> .....	25
<b>3.5. Ensaio de purificação das frações PIV, PV e PVI da exclusão molecular</b> .....	26
<i>3.5.1. Material</i> .....	26
<i>3.5.2. Método</i> .....	26
<b>3.6. Caracterização bioquímica – Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular relativa (Mr)</b> .....	27

3.6.1. <i>Material</i> .....	27
3.6.2. <i>Método</i> .....	28
<b>3.7. Caracterização enzimática – Atividade fibrinogenolítica</b> .....	29
3.7.1. <i>Material</i> .....	29
3.7.2. <i>Método</i> .....	29
<b>3.8. Caracterização Enzimática – Atividade proteolítica sobre a Caseína</b> .....	30
3.8.1. <i>Material</i> .....	31
3.8.2. <i>Método</i> .....	31
<b>3.9. Ensaio antimicrobiano do veneno bruto – Mínima Concentração Inibitória (MIC)</b> .....	32
3.9.1. <i>Material</i> .....	32
3.9.2. <i>Método</i> .....	33
<b>4. RESULTADOS</b> .....	35
<b>4.1. Separação Inicial – Cromatografia de Exclusão Molecular</b> .....	35
<b>4.2. Ensaio de purificação da fração PI da exclusão molecular</b> .....	37
<b>4.3. Ensaio de purificação da fração PII da exclusão molecular</b> .....	41
<b>4.4. Ensaio de purificação das frações PIV, PV e PVI da exclusão molecular</b> .....	43
<b>4.5. Atividade Fibrinogenolítica</b> .....	45
4.5.1. <i>Atividade fibrinogenolítica da Serino Protease</i> .....	45
4.5.2. <i>Atividade fibrinogenolítica da Metalo Protease de 28 kDa</i> .....	47
4.5.3. <i>Atividade fibrinogenolítica da Metalo Protease de 65 kDa</i> .....	49
<b>4.6. Atividade proteolítica sobre a Caseína</b> .....	51
<b>4.7. Ensaio antimicrobiano do veneno bruto – Mínima Concentração Inibitória (MIC)</b> .....	53
<b>5. DISCUSSÃO</b> .....	54
<b>6. CONCLUSÕES</b> .....	60
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	61

## Lista de Figuras

		<u>Pág.</u>
<b>Figura 1</b>	Cromatograma resultante da cromatografia de exclusão molecular do veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> .....	36
<b>Figura 2</b>	SDS-PAGE corado com nitrato de prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de exclusão molecular.....	36
<b>Figura 3</b>	Cromatograma resultante da cromatografia de troca aniônica do PI da exclusão molecular.....	38
<b>Figura 4</b>	SDS-PAGE em coloração prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de troca aniônica do PI.....	38
<b>Figura 5</b>	Cromatograma resultante da cromatografia de troca aniônica do PI4.....	40
<b>Figura 6</b>	SDS-PAGE em coloração prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de troca aniônica do PI4.....	40
<b>Figura 7</b>	Cromatograma resultante da cromatografia de afinidade à benzamidina do PII.....	42
<b>Figura 8</b>	SDS-PAGE em coloração prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de afinidade à benzamidina.....	42
<b>Figura 9</b>	Cromatograma resultante da cromatografia de troca catiônica dos picos PIV, PV e PVI.....	44
<b>Figura 10</b>	SDS-PAGE em coloração prata correspondente às frações resultantes da cromatografia de troca catiônica dos picos PIV, PV e PVI.....	44
<b>Figura 11</b>	SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da serino protease variando-se o fator concentração de proteína.....	46
<b>Figura 12</b>	SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da serino protease variando-se o fator tempo de incubação.....	46
<b>Figura 13</b>	SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 28 kDa variando-se o fator concentração de proteína.....	48

<b>Figura 14</b>	SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 28 kDa variando-se o fator tempo de incubação.....	48
<b>Figura 15</b>	SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 65 kDa variando-se o fator concentração de proteína.....	50
<b>Figura 16</b>	SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 65 kDa variando-se o fator tempo de incubação.....	50
<b>Figura 17</b>	Atividade proteolítica do veneno bruto e metalo proteinases de 28 e 65 kDa sobre a caseína.....	52
<b>Figura 18</b>	Teste da mínima concentração inibitória do veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> em <i>Staphylococcus aureus</i> .....	53
<b>Figura 19</b>	Teste da mínima concentração inibitória do veneno bruto de <i>Bothrops leucurus</i> em <i>Escherichia coli</i> .....	53



## Lista de Tabelas

	<u>Pág.</u>
<b>Tabela 1</b> Condições utilizadas no teste de atividade fibrinogenolítica variando-se o fator concentração de proteína.....	30
<b>Tabela 2</b> Condições utilizadas no teste de atividade fibrinogenolítica variando-se o fator tempo de incubação.....	30
<b>Tabela 3</b> Concentrações do veneno bruto e do cloranfenicol utilizadas no teste MIC após a adição do meio de cultura contendo a suspensão de microrganismos.....	34

## **Lista de Abreviaturas e Siglas**

ATCC – American Type Culture Collection

CLSI – Clinical and Laboratory Standards Institute

HPLC – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LAAO – L-Aminoácido Oxidase

MIC – Mínima Concentração Inibitória

PLA2 – Fosfolipase A2

SDS – Dodecil-sulfato de Sódio

SDS-PAGE – Dodecil-sulfato de Sódio Gel de Eletroforese de Poliacrilamida

SV-LAAO – L-Aminoácido Oxidase do Veneno de Serpentes

SVMPs – Metallo Proteinases do Veneno de Serpentes

SVSPs – Serino Proteinases do Veneno de Serpentes

SVTLE – Enzimas Semelhantes à Trombina do Veneno de Serpentes

TCA – Ácido Tricloro Acético

TLE – Enzimas Semelhantes à Trombina

TTC – Cloreto de Trifenil Tetrazólio

## RESUMO

Os venenos de serpentes são constituídos por uma complexa mistura de substâncias que apresentam características e proporções variáveis de acordo com as diferentes espécies, distribuição geográfica dos indivíduos, variação ontogenética e sexual e alimentação. Essa variabilidade na composição dos venenos é de grande interesse na pesquisa e desenvolvimento de novos fármacos, pois um elevado grau de variação aumenta o número de seus potenciais usos. De acordo com essas propriedades dos venenos de serpentes, no presente estudo procurou-se comparar algumas variações existentes nas frações do veneno de *Bothrops leucurus*, uma serpente da família Viperidae que se caracteriza por produzir um veneno com toxicidade variável devido a diferentes fatores. A toxicidade do veneno deve-se principalmente à sua fração proteica, constituída em sua maior parte por proteinases (metalo proteinases e serino proteinases), fosfolipases e L-aminoácido oxidases que apresentam efeitos potenciais no sistema homeostático, além de possuírem ação citotóxica, antimicrobiana e inflamatória. Neste estudo foram realizados ensaios cromatográficos para a purificação de algumas dessas enzimas e a caracterização das mesmas para a verificação de suas propriedades proteolíticas e fibrinogenolíticas, além do potencial antimicrobiano do veneno bruto. Foram purificadas duas metalo proteinases de 28 e 65 kDa, respectivamente, uma serino protease de 35 kDa, uma LAAO de 66 kDa e duas fosfolipases com 14 e 15kDa. Constatou-se que a metalo protease de 65 kDa apresentou a maior atividade fibrinogenolítica. Além disso, foi realizado o teste da mínima concentração inibitória com o veneno bruto para verificar seu efeito antimicrobiano contra uma bactéria gram-negativa e outra gram-positiva, sendo que nesta última, apresentou atividade inibitória.

**Palavras-chave:** *Bothrops leucurus*, veneno de serpentes, purificação de proteínas, atividade fibrinogenolítica, mínima concentração inibitória.

## **ABSTRACT**

*The snake's venoms are constituted by a mixture of substances that exhibit character and variable proportion according to different species, geographic distribution of individuals, ontogenetic and sexual and feed variability. That variability on poisons compositions is of great interest on research and development of new drugs, because a high degree of variation increases the number of potential use. According to those properties of snake's poisons in the actual study it was sought to compare some variations existents on fractions of Bothrops leucurus venom, a snake of family Viperidae that is characterized by production of poison with variable toxicity due different factors. The poison toxicity should principally its protein fraction consisting mostly by proteinases (metalloproteinases and serine protease), phospholipases and L-aminoacid oxidases showing potential effects on homeostatic system, beyond having cytotoxic action, bactericidal and inflammatory. This study describe chromatographic separation of some enzymes and characterization of it and to verification of its proteolytic and fibrinogenolytic properties further the bactericidal potential of crude venom. Was purified two metalloproteinases of 28 and 65 kDa respectively, a serine protease of 35 kDa, a LAAO of 66 kDa and two phospholipases of 14 and 15kDa. It was found metalloproteinase of 65 kDa show a higher fibrinogenolytic activity. Futhermore crude venom was carried out the test of minimum inhibitory concentration with crude venom to check its antimicrobial effect against a gram-negative bacterium and other gram-positive, whereas in the latter showed inhibitory effect.*

**Keyword:** *Bothrops leucurus, snake's venom, protein purification, fibrinogenolytic activity, minimum inhibitory concentration.*

## 1. INTRODUÇÃO

A classificação das serpentes é essencial para o reconhecimento de espécies de valor na medicina, para os estudos toxicológicos e é de grande importância na formulação de antivenenos no tratamento de pacientes (WÜSTER et al., 1997, 1998, 1999). São répteis pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata, classe Reptilia, subordem Serpentes (POUGH et al., 1999). São representadas atualmente por mais de 3.150 espécies (VIDAL et al., 2007), sendo que a grande maioria delas, cerca de 2.700, pertencem a um evento único de diversificação massiva que ocorreu depois do limite Cretáceo-Triássico (K-T) e extinção dos dinossauros. Este grupo amplo e relativamente recente é conhecido como Caenophidia ou “serpentes avançadas”, sendo caracterizado por possuir um sistema de transferência de veneno ou apenas alguns componentes desse sistema (VONK et al., 2008). As demais serpentes, classificadas tradicionalmente como “Colubridae”, apresentam uma glândula de veneno e ausência de presas na parte frontal da boca para inoculá-lo, sendo que o veneno não é perigoso para humanos. “Colubridae” demonstrou ser um grupo parafilético, com muitas de suas subfamílias recentemente elevadas ao patamar de família para refletir sua distinção evolutiva em relação ao grupo Caenophidia (VIDAL et al., 2007; VONK et al., 2008). Sugere-se que, inicialmente, as secreções produzidas pelas serpentes ancestrais apresentavam enzimas similares às secretadas pelo pâncreas de forma a auxiliar a digestão de presas que evoluíram, culminando no desenvolvimento de um aparato venenífero (KOCHVA, 1987). A função biológica dessas secreções permitiria uma maior eficácia para a captura, subjugação, morte de presas e detenção de eventuais predadores, contribuindo decididamente para o sucesso reprodutivo da espécie (CHIPPAUX et al., 1991; MEBS, 1999; KARDONG, 2002).

As serpentes peçonhentas (aproximadamente 600 espécies) são representadas pela família Elapidae e Viperidae: Elapidae – os indivíduos são proteróglifos, em que as presas são fixas na parte frontal da maxila, possuem cabeça arredondada e sem fossetas loreais (gênero *Micrurus*); Viperidae – indivíduos solenóglifos, com maxila encurtada e dentes móveis, podendo ser identificados pela cabeça triangular e pela presença de fossetas loreais (subfamília Crotalinae, gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*). Interessante ressaltar que a classificação das serpentes em peçonhentas e não peçonhentas leva em consideração a capacidade destas em inocularem o veneno nas suas vítimas. As serpentes áglifas (presa posterior não especializada ou inexistente) e opistóglifas (presa posterior ampliada ou sulcada) são ditas não peçonhentas (JACKSON, 2003) por não apresentarem um mecanismo

eficiente de inoculação, entretanto, esse veneno é produzido e armazenado em glândulas, sendo rico em toxinas de importância farmacológica, embora não sendo tão explorado como nos venenos de serpentes peçonhentas (VONK et al., 2011).

A família Viperidae, dentre as famílias de serpentes atualmente conhecidas, apresenta o mais alto grau de especialização no aparelho venenífero, portando um complexo sistema de produção e estocagem de veneno, associado a modificações morfológicas importantes como uma musculatura especializada ao redor das glândulas de veneno, perda dos dentes do palato, além de presas móveis caniculadas na parte anterior do maxilar, que se elevam no momento do bote (KOCHVA, 1987). Nessas serpentes as secreções das glândulas de veneno são inoculadas pelas presas, que são dentes modificados, situados anteriormente no maxilar superior, podendo apresentar sulco (proteróglifas) ou canal (solenóglifas) (JACKSON, 2003). A presença de fossetas loreais, que são aberturas localizadas entre as narinas e os olhos (BARRET et al., 1970), também exerce grande vantagem na captura de suas vítimas. Esses órgãos compõem um sistema sensorial único e altamente especializado que detecta a radiação infravermelha de predadores ou presas, permitindo a localização desses animais com grande precisão e rapidez (GRACHEVA et al., 2010).

O Brasil apresenta uma das mais ricas faunas de serpentes, sendo conhecidas 375 espécies (BÉRNILS, COSTA, 2011), pertencentes atualmente à 9 famílias: Anomalepididae (7 espécies), Leptotyphlopidae (15 espécies), Typhlopidae (6 espécies), Aniliidae (1 espécie), Tropidophiidae (1 espécie), Boidae (12 espécies), Colubridae (278 espécies), Elapidae (27 espécies) e Viperidae (28 espécies). As serpentes peçonhentas no país pertencem a duas famílias: Viperidae (acidentes botrópico, crotálico e laquétrico) e Elapidae (acidente elapídico). A proporção dos casos anuais e as respectivas taxas de letalidade revelam que 90% são acidentes botrópicos (letalidade de 0,31%), seguido de crotálicos (7,7%, com 1,87% de letalidade), laquétricos 1,4% (0,95% de letalidade) e elapídicos 0,4% (0,52% de letalidade) (ARAÚJO et al., 2003).

Dentre as famílias de serpentes peçonhentas existentes no Brasil, destaca-se a família Viperidae, seja pela gravidade dos acidentes que causam, seja pela ampla utilização de seus venenos em pesquisas. Dentre as serpentes viventes, a subfamília Crotalinae compreende, aproximadamente, 75% das serpentes da família Viperidae e 6% do total de serpentes do planeta. Elas vivem em uma variedade de biomas e hábitat em três continentes, em regiões temperadas e tropicais, apresentando comprimento variável de 50 centímetros a 4 metros. Apesar de sua grande importância médica, os dados relacionados à história natural e ecologia da família Viperidae ou sobre a fauna de serpentes das regiões neotropicais ainda são escassos

ou inexistentes e a biologia de muitas espécies permanece desconhecida. Isso se deve aos hábitos de vida e comportamento desses répteis (MARTINS et al., 2002), sendo que as pesquisas feitas com o veneno dessas serpentes são provenientes de animais que foram retirados do ambiente natural para serem mantidos em serpentários.

A serpente *Bothrops leucurus*, também conhecida como jararaca-da-cauda-branca ou simplesmente jararaca (WAGLER, 1824), pertence à família Viperidae, subfamília Crotalinae é considerada a Viperidae mais importante da zona do Atlântico da Região Nordeste do Brasil, sendo que sua incidência varia desde o norte da Região Sudeste (Espírito Santo) até o Nordeste brasileiro. A distribuição dessa espécie é a mais ampla, se estendendo para o norte do Estado do Maranhão, sul do Ceará e na Bahia ela ocorre na Chapada Diamantina e no Chapadão Ocidental de São Francisco (MELGAREJO, 2003). É comum em áreas florestadas do Nordeste e se adapta bem em ambientes urbanos, incluindo os ambientes peridomiciliares. Foi registrada a incidência dessa espécie também na região de Caatinga na Bahia (ULLOA et al., 2004), em que prevalece a vegetação secundária desse tipo de ecossistema, altamente impactado pela ação antrópica. Além disso, ela também foi localizada em remanescentes da Mata Atlântica no Estado de Pernambuco. Essa incidência indica que *B. leucurus* está aumentando a sua distribuição geográfica para áreas com diferentes características pedoclimáticas e vegetacionais, invadindo diferentes biotas, fato provavelmente favorecido pelo desmatamento e pela sua grande plasticidade ecológica (GUARNIERI et al., 2000; LIMA-DUARTE et al., 2003).

Caracteriza-se por ser uma espécie polimórfica com diversos padrões de coloração que variam geográfica, ontogenética e sexualmente. Puerto e colaboradores (2001) determinaram que, em estudos taxonômicos e de identificação dessa espécie, deve-se considerar esses fatores variantes de coloração separadamente, como por exemplo, os espécimes que habitam regiões de Mata Atlântica que apresentam pigmentação nas laterais da cabeça, como uma coloração críptica estratégia de defesa na vegetação rasteira da Mata, coloração essa ausente em espécimes que habitam a Caatinga, por exemplo. A variação na coloração ontogenética, ou seja, que se altera de acordo com o estágio de desenvolvimento do indivíduo, pode ser explicada pela diferença de hábitos alimentares que essas serpentes apresentam com o transcorrer da vida. Os indivíduos jovens alimentam-se preferencialmente de lagartos, enquanto os adultos alimentam-se de roedores (LIRA-DA-SILVA et al., 1996). Em cada estágio, os indivíduos desenvolvem uma coloração conspícua na cauda que tem por função atrair esses diferentes tipos de presas (MARTINS et al., 2002).

O veneno produzido por essa espécie apresenta toxicidade variável de acordo com a localização geográfica e sexo dos indivíduos (LIRA-DA-SILVA, 2001). Quanto à sua composição, verificou-se que apresenta praticamente a mesma constituição que o veneno de outras espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, incluindo *Bothrops jararaca* (SANCHEZ et al., 1992), entretanto, seu veneno apresenta uma quantidade menor de compostos responsáveis pelos efeitos tóxicos do veneno quando comparada às demais espécies da América do Sul. As fêmeas produzem e secretam um volume maior de veneno em relação aos machos (LIRA-DA-SILVA, 2001). Um número considerável de estudos do veneno dessa espécie foi realizado até o momento. Dentre eles destacam-se os estudos de purificação, caracterização estrutural e enzimática das proteínas presentes no mesmo (BELLO et al., 2006; GREMSKI et al., 2007; HIGUCHI et al., 2007; MAGALHÃES et al., 2007; SANCHEZ et al., 2007; SILVA et al., 2007; FERREIRA et al., 2009; TORRES et al., 2010; GOMES et al., 2011; NAUMANN et al., 2011; NUNES et al., 2011; GABRIEL et al., 2012; NUNES et al., 2012a) e, mais recentemente, estudos voltados para a aplicação do veneno dessa espécie na inibição do crescimento de células tumorais (NUNES et al., 2012b) e sua citotoxicidade (MORAIS et al., 2012).

### **1.1. Venenos de Serpentes**

Os venenos ofídicos são largamente distribuídos na natureza e evoluíram por interferirem em diversos processos fisiológicos. Essas toxinas apresentam diversas funções biológicas, sendo usadas no ataque, defesa e imobilização da presa para facilitar a sua digestão (LEWIS, GUTMANN, 2004; TEIXEIRA et al., 2005). São constituídos por uma complexa mistura de compostos que apresentam características e proporções variáveis de acordo com as diferentes espécies, apresentando tanto componentes proteicos como não proteicos, com diferentes estruturas e atividades bioquímicas específicas (PAL et al., 2002; PORTO et al., 2007). De maneira geral, os compostos enzimáticos contribuem para a imobilização e digestão da presa, por outro lado, os não enzimáticos agem na imobilização (KINI, FOX, 2013). Todos estes componentes sofrem grande variabilidade dentro das famílias, gêneros e espécies, tanto inter como intraespecífica, as quais são decorrentes da idade, sexo, sazonalidade, variação geográfica (CHIPPAUX et al., 1991) e alimentação dos indivíduos (BARLOW et al., 2009). Os venenos das serpentes da família Crotalidae, por exemplo, (gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*) são mais complexos que os de outras



famílias e contêm proteínas de maior massa molecular. São ainda particularmente importantes, pois os gêneros acima citados são abundantes na América do Sul e causam a maior parte dos acidentes ofídicos em humanos (VARANDA, GIANNINI, 1999).

Os maiores componentes proteicos do veneno (cerca de 90% do peso seco), com ou sem atividade catalítica, são neurotoxinas, cardiotoxinas, lectinas, disintegrinas, peptídeos natriuréticos, proteinases (metalo proteinases, serino proteinases), fosfolipases, fosfodiesterases, nucleotidasas, hialuronidasas, acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C e L-aminoácido oxidases (PORTO et al., 2007). Além desses compostos, podem-se encontrar ainda, compostos orgânicos de baixa massa molecular (carboidratos, serotonina, histamina, citrato e nucleosídeos), íons inorgânicos (cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro e potássio) e os inibidores enzimáticos (STOCKER, 1990). Dentre esses compostos, alguns carboidratos, nucleosídeos, lipídeos e íons metálicos ainda não apresentam função conhecida (FOX et al., 2008a; GEORGIEVA, et al., 2008). As enzimas presentes induzem vários efeitos farmacológicos, incluindo neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragia, hemólise, procoagulante e anticoagulante (BAILEY, WILCE, 2001; KINI, 2007). Dentre todos os compostos presentes nos venenos de serpentes, os componentes predominantes são os peptídeos e as proteínas, sendo que dentre elas, as que merecem destaque são as enzimas fosfolipase A2, L-aminoácido oxidase, metalo proteinases e as serino proteinases devido ao seu valor farmacológico, medicinal e biotecnológico.

Nas pesquisas farmacológicas, a variação na composição do veneno de acordo com os fatores mencionados é certamente o centro do interesse do potencial que as moléculas presentes no veneno representam, sendo que um elevado grau de variação na sua composição aumenta o número de seus potenciais usos. Reconhecendo-se o significado biomédico crucial das variações nos venenos, ressalta-se a importância dos esforços em se conhecer e conservar a diversidade biológica, desde espécies como um todo até os indivíduos pertencentes às mesmas. Isso enfatiza a importância de trabalhos de coleta de amostras de venenos de uma ampla variedade de espécies e espécimes de diferentes localidades geográficas e idades (VONK et al., 2008).

### *1.1.1. Fosfolipases*

As fosfolipases são enzimas cálcio-dependentes, intra e extracelulares, com ampla distribuição na natureza. São sintetizadas no pâncreas de mamíferos, em venenos de alguns animais, como abelhas, vespas (HARRIS, 1991) e serpentes, além de serem produzidas também em plantas. Podem ser constituídas por uma cadeia simples, com massa molecular

que varia de 14 a 19 kDa (MURAKAMI, KUDO, 2004). As fosfolipases A2 – PLA2 (EC 3.1.1.4) – constituem uma classe de enzimas que catalisam a hidrólise dos fosfolipídeos, gerando ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos como produtos (VAN DEENEN, DE HAAS, 1963).

De acordo com a classificação usual, são distribuídas em quatro grupos principais de acordo com a massa molecular e o padrão de pontes dissulfeto. Entretanto, mais recentemente, foram propostos 15 grupos diferentes de fosfolipases com base em critérios estruturais e bioquímicos, considerando aspectos adicionais como os substratos fosfolipídicos, a sequência completa de aminoácidos, dependência de íons cálcio e mecanismo de catálise (SCHALOSKE, DENNIS, 2006; DENNIS et al., 2011). De acordo com a classificação usual, os venenos de serpentes são ricos em PLA2 dos grupos I e II. Esses dois grupos se diferem, principalmente, quanto à posição de uma das sete pontes dissulfeto e pela presença de uma pequena extensão C-terminal no grupo II (ARNI, WARD, 1996). O grupo II pode ser subdividido em dois subgrupos principais, dependendo do resíduo na posição 49 na estrutura primária: Asp49 são enzimaticamente ativas, enquanto que Lys49 apresentam baixas ou nenhuma atividade enzimática (LOMONTE et al., 2003). As enzimas do grupo I foram isoladas do pâncreas de mamíferos e venenos de serpentes das famílias Elapidae e Hydrophiidae. As fosfolipases do grupo II estão presentes nos venenos de Crotalidae e Viperidae, bem como em diversos tecidos não pancreáticos de mamíferos (ARNI, WARD, 1996; OWNBY et al., 1999; SIX, DENNIS, 2000).

As fosfolipases A2 presentes nos venenos ofídicos, além de sua participação na digestão de presas apresentam um grande espectro de atividades que incluem ação hemolítica indireta, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, agregadora de plaquetas, anticoagulante, edematogênica, miotóxica, bactericida e pró-inflamatória. Nos venenos botrópicos, estas enzimas estão relacionadas à mionecrose local que pode provocar sequelas drásticas, como perda tecidual permanente, incapacidade ou amputação do membro afetado (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2002; BARBOSA et al., 2005; ABREU et al., 2007; CALGAROTTO et al., 2008; ANGULO, LOMONTE, 2009). Foi evidenciado que a habilidade dessas enzimas em alcançar um órgão ou tecido característicos está relacionada à sua afinidade por proteínas específicas que agem como receptores. Alguns estudos demonstraram que modificações químicas induzem a perda da atividade enzimática e da toxicidade em algumas fosfolipases de venenos de serpentes (SOARES, GIGLIO, 2003; SOARES et al., 2004; MARCUSSI et al., 2007; DENNIS et al., 2011).

São enzimas de elevado interesse médico-científico devido ao seu envolvimento em um grande número de doenças inflamatórias humanas, bem como, em envenenamentos por venenos de serpentes e abelhas. Elas apresentam papel importante no metabolismo de lipídeos dietéticos e no metabolismo geral de lipídeos estruturais das membranas celulares. A hidrólise dos lipídeos das membranas celulares promove a perda da sua estrutura, comprometendo a permeabilidade seletiva (ARNI, WARD, 1996; KINI, 2003). Além disso, podem se associar a outras moléculas que modulam a sua atividade e especificidade (LIZANO et al., 2003). Várias enzimas PLA2 presentes em venenos de serpentes foram purificadas e caracterizadas (CHWETZOFF et al., 1989; KINI, 2005; SANTOS-FILHO et al., 2008; VARGAS et al., 2012).

### 1.1.2. *L-aminoácido oxidases*

As flavoenzimas L-aminoácido oxidases (LAAO, EC 1.4.3.2) já foram isoladas de diversos organismos e produtos do seu metabolismo, como bactérias (ARIMA et al., 2009), fungos (YANG et al., 2009), muco da pele de peixes (KITANI et al., 2007; NAGASHIMA et al., 2009), algas verdes (KASAI et al., 2010) e venenos de serpentes (STABELI et al., 2007; NAUMANN et al., 2011), sendo que neste último é frequentemente o principal componente (SV-LAAO), correspondendo a cerca de 30% do total em algumas espécies (ZELLER, 1977). A SV-LAAO é a responsável pela coloração amarela característica dos venenos brutos (STABELI et al., 2007; TEMPONE et al., 2001). É uma glicoproteína que quando purificada apresenta massa molecular entre 120-150 kDa na forma nativa e 55-66 kDa nas suas formas monoméricas (TAN, SAIFUDDIN, 1989; ABE et al., 1998).

As L-aminoácido oxidases desempenham muitas atividades patológicas, como a citotoxicidade (ALVES et al., 2008; RODRIGUES et al., 2009; MORAIS et al., 2012), inibição da agregação plaquetária (LI et al., 1994; ALVES et al., 2008) e atividade bactericida e antiviral, promovendo a supressão do crescimento de procariotos Gram-positivos e Gram-negativos, bem como o vírus HIV (EHARA, et al, 2002; ZHANG et al., 2003; STABELI et al., 2007; CISCOTTO et al., 2009), entretanto, suas funções *in vivo* ainda permanecem incertas (MACHEROUX et al., 2001). O caminho ou mecanismo em que as SV-LAAOs participam da toxicidade dos venenos é atualmente desconhecido. Entretanto, essa enzima libera  $H_2O_2$  quando oxidada, o que provavelmente desempenha um importante papel na toxicidade dos venenos, pois a atividade antibacteriana da LAAO é inibida por catalase (STABELI et al., 2007). A LAAO é a única oxidase FAD-dependente encontrada no veneno de serpentes (DU, CLEMETSON, 2002; BRAGA et al., 2008). A citotoxicidade, ou seja, a

indução da morte de células de mamíferos, incluindo células tumorais e carcinomas (NAUMANN et al., 2011) também se deve à formação de altas concentrações de  $H_2O_2$  (TORII et al., 2000; ANDE et al., 2006). É interessante notar que a apoptose induzida por essa enzima é diferente do que a ocasionada pelo  $H_2O_2$  exógeno, sugerindo que o modo de liberação do  $H_2O_2$  é um fator importante (SUHR, KIM, 1999). A LAAO também é citotóxica contra algumas fases do desenvolvimento de *Leishmania* sp. (FRANÇA et al., 2007; NAUMANN et al., 2011).

As diferentes LAAOs apresentam particularidades no que se refere à organização estrutural, especificidade de substrato, bem como em suas propriedades biológicas. Assim, a LAAO de ofídios tem sido um alvo atrativo para pesquisas em bioquímica molecular, fisiologia e medicina devido aos seus múltiplos efeitos em diversas células. Atualmente existem informações estruturais detalhadas de apenas cinco LAAOs, uma presente na bactéria *Rhodococcus opacus* (FAUST et al., 2007) e as outras quatro SV-LAAOs: *Agkistrodon halys pallas* (ZHANG et al., 2004), *Calloselasma rhodostoma* (MOUSTAFA et al., 2006), *Vipera ammodytes ammodytes* (GEORGIEVA et al., 2011) e *Bothrops jararacussu* (ULLAH, et al., 2012).

Naumann e colaboradores (2011) estudaram vários aspectos da LAAO presente no veneno de *Bothrops leucurus*, concluindo que essa enzima apresenta características de uma citotoxina, que age principalmente por produzir quantidades elevadas de  $H_2O_2$  que provocam a morte celular. Entretanto, o mecanismo funcional e a correspondente base estrutural da atividade dessa flavoproteína ainda precisam ser investigados em detalhes. O conhecimento do mecanismo de ação dessa e de outras toxinas animais, permitem considerar o uso da LAAO como agente anti-cancerígeno e como ferramenta em estudos bioquímicos para a investigação de processos celulares e também uma melhor compreensão dos mecanismos de envenenamento.

### 1.1.3. *Proteinases*

Proteinases estão presentes nos venenos de inúmeras serpentes e são classificadas em metalo proteinases (SVMPs) e serino proteinases (SVSPs) de acordo com a organização do sítio catalítico e às funções que exercem no envenenamento.

#### ***Metallo proteinases***

De modo geral, os venenos de serpentes contêm pelo menos 30% de metalo proteinases, também conhecidas como SVMPs (Snake Venom Metalloproteinases). São enzimas sintetizadas nas glândulas produtoras de veneno como pró-enzimas e que apresentam um

domínio zinco-proteinase preservado (domínio M) que controla a sua ação catalítica (STOCKER et al., 1995; STROKA et al., 2005; SWENSON, MARKLAND, 2005; MORAES, SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006; RAMOS, SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). São agrupadas em quatro classes distintas de acordo com a organização de seu domínio catalítico e de sua massa molecular: Classe P-I apresenta massa molecular entre 20 e 30 kDa; Classe P-II com massa molecular entre 30 e 50 kDa; Classe P-III com massa molecular entre 50 e 80 kDa e Classe P-IV, com massa molecular entre 80 e 100 kDa (HITE et al., 1994; BJARNASON, FOX, 1995; SERRANO, FOX, 2005).

As SVMPs apresentam um papel potencialmente significativo na patogênese relacionada ao envenenamento, sendo os principais fatores responsáveis pela hemorragia sistêmica e local, coagulação intravascular, edema, inflamação e necrose (IWANAGA, SUZUKI, 1979; BJARNASON, FOX, 1994; FOX, SERRANO, 2005, 2009). Agem nas células endoteliais causando a ruptura das paredes dos vasos sanguíneos, permitindo a evasão do sangue (GUTIERREZ et al., 2005). A atividade hemorrágica das SVMPs está entre os fatores de maior letalidade presente no veneno de serpentes. Certas metalo proteinases não apresentam atividade hemorrágica, mas agem por meio de diferentes mecanismos como o rompimento da homeostase mediado por efeitos pró e/ou anticoagulantes, inibição da agregação plaquetária e apoptose ou atividades pró-inflamatórias (MARKLAND, 1998; GUTIERREZ et al., 2005).

As metalo proteinases apresentam um interesse particular devido à sua possível aplicação farmacêutica e clínica por interferirem no sistema hemostático. Ao longo dos últimos 50-60 anos, muitas dessas enzimas foram purificadas de venenos brutos e sua caracterização tem demonstrado um importante papel associado à patologia do envenenamento e muitos outros estudos indicam que essas enzimas podem apresentar aplicações clínicas associadas ao desenvolvimento de novas drogas, especialmente quando interagem com o sistema de coagulação do sangue (BRAUD et al., 2000; MATSUI et al., 2000; LEE HO et al., 2002; WHITE, 2005; KOH et al., 2006; FOX, SERRANO, 2009, ESCALANTE et al., 2011; PAES LEME et al., 2012). Estudos recentes analisaram o potencial citotóxico de uma metalo protease (leucuroliisa-b) presente no veneno de *Bothrops leucurus* que promoveu a inibição do crescimento de células tumorais em alguns tipos de câncer (GABRIEL et al., 2012).

### ***Serino proteinases***

As serino proteinases ou SVSPs (Snake Venom Serine Protease) constituem um terço de todas as proteinases e são caracterizadas pela presença de um resíduo de Ser no sítio ativo (BLOW, 1997), diferenciando-se das metalo proteinases que apresentam o íon  $Zn^{+}$ . São

enzimas que podem ser encontradas em microrganismos, plantas, animais e venenos de animais (BRAUD et al., 2000). Apresentam massa molecular variando entre 26 e 67 kDa com diversos níveis de glicosilação (SERRANO, MAROUN, 2005).

As SVSPs estão associadas aos distúrbios hemostáticos devido à sua atuação nos componentes da cascata da coagulação sanguínea e do sistema fibrino(geno)lítico (BRAUD et al., 2000; SERRANO, MAROUN, 2005). Apresentam outras funções, podendo estar envolvidas na digestão da presa, ativação do sistema complemento e diferenciação celular. Individualmente, essas enzimas não são consideradas letais, mas elas contribuem para o efeito tóxico quando combinadas com outras proteínas presentes no veneno (BRAUD et al., 2000). Na captura de presas, as serino proteinases agem em conjunto com as metalo proteinases, que também podem apresentar atividade fibrinogenolítica, produzindo uma hemorragia incontrolável no animal capturado, facilitando sua digestão (GUTIÉRREZ et al., 2009).

O interesse médico e científico nessas enzimas semelhantes à trombina tem crescido consideravelmente devido a diferenças específicas quando comparada à trombina, que é uma enzima multifuncional (MARSH, WILLIAMS, 2005). As serino proteinases são promissoras na medicina clínica como agentes desfibrinantes, que podem ser utilizados em pacientes que sofrem de trombose, infarto cerebral e do miocárdio, doença vascular periférica e isquemia aguda (KOH et al., 2006; MACKESSY, 2010). Adicionalmente, algumas SVSPs já foram utilizadas na preparação de selantes de fibrina, que são produtos adesivos cirúrgicos muito efetivos usados em diferentes condições médicas (DASCOMBE et al., 1997; BARROS et al., 2009). Além disso, apresentam diversos usos laboratoriais, como por exemplo, a identificação de fibrinogênio em amostras sanguíneas e estudos de coagulação (MARSH, WILLIAMS, 2005).

#### *1.1.4. Utilização dos venenos de serpentes em biotecnologia e produção de fármacos*

Nas últimas décadas, pesquisadores com diversos conhecimentos e especialidades, como medicina clínica, farmacologia, fisiologia, bioquímica, biologia evolutiva, biologia molecular, biologia estrutural, enzimologia, química de proteínas, biofísica e toxinologia, tanto de forma isolada como em colaboração, têm estudado os venenos de serpentes (i) para determinar o modo e mecanismo de ação das toxinas; (ii) para encontrar formas e meios para neutralizar a toxicidade e os efeitos adversos do envenenamento; (iii) para desenvolver ferramentas específicas que sejam úteis no entendimento dos processos fisiológicos normais nos níveis celular e molecular; e (iv) para desenvolver protótipos de agentes farmacêuticos com base na estrutura das toxinas (KINI, 2002), tendo grande importância em aplicações nas

áreas de biotecnologia e produção de medicamentos (LEWIS, GUTMANN, 2004; TEIXEIRA et al., 2005).

Um grande número de proteínas presentes nos venenos afeta o sistema hemostático (MARKLAND JR, 1998), podendo agir como procoagulante, anticoagulante, fibrinolítico ou ativador de plaquetas. Com isso, algumas substâncias e fármacos foram estudados e desenvolvidos, como o ancrod (Arvin) proveniente do veneno de *Calloselasma rhodostoma* e a crotalase proveniente do veneno de *Crotalus adamanteus*, que são utilizados como agentes desfibrinantes para diversas condições clínicas, incluindo a trombose venosa profunda, infarto do miocárdio e embolia pulmonar (MARKLAND, 1998). A droga Aggrastat (tirofiban) foi desenvolvida a partir de um composto presente no veneno de *Echis carinatus* e é utilizada como droga antiplaquetária (HARTMAN et al., 1992), ministrada a pacientes com angina instável. Alguns compostos dos venenos com propriedades anticoagulantes são aplicados no diagnóstico de anormalidades da coagulação, no estudo de padrões de coagulação e do fibrinogênio no plasma como, por exemplo, a batroxobina, uma enzima semelhante à trombina purificada a partir do veneno de *Bothrops atrox* (STOCKER, 1990).

Alguns venenos de serpentes criam uma condição transitória de diminuição da pressão sanguínea em pacientes envenenados. Os inibidores da enzima conversora da angiotensina (ACE) foram desenvolvidos de uma enzima potencializadora da bradicinina isolada da serpente brasileira *Bothrops jararaca*, sendo aprovada em 1979 pela FDA (CUSHMAN et al., 1979) para ser utilizada em tratamentos de hipertensão e doenças do coração. Elas atuam bloqueando a conversão da angiotensina I em angiotensina II, esta última atua como vasoconstritor. Esses inibidores são prescritos atualmente em todo o mundo, salvando milhões de vidas (VONK et al., 2011).

Devido às propriedades analgésicas do veneno de *Ophiophagus hannah*, foi desenvolvido medicamento Hannalgesin (PU et al., 1995). Toxinas promissoras foram isoladas da cascavel tropical *Crotalus durissus terrificus* e de muitas outras espécies relacionadas. Compostos derivados do veneno da espécie asiática *Naja kaouthia* já são usados na medicina alternativa. Sendo mais eficaz que a morfina, esse veneno é utilizado desde os anos de 1930 no tratamento da dor em pacientes com câncer (VONK et al., 2011).

Existe uma série de pesquisas voltadas à propriedade anticâncer desses venenos. Por exemplo, os tumores malignos do cérebro e coluna vertebral (gliomas) não são curados por meio de cirurgias, pois eles invadem os arredores do tecido cerebral sem limites definidos, fazendo com que sua remoção seja impossível. As disintegrinas, como a contortostatina presente no veneno de *Agkistrodon contortrix*, previne que as células fiquem unidas e inibe a

sua interação com o tecido circundante, resultando no bloqueio da mobilidade celular e invasividade (TRIKHA et al., 1994). Já foi demonstrado que a fibrina/fibrinogênio desempenham papéis separados e distintos em diferentes estágios do crescimento e disseminação tumoral. Primeiramente, a deposição de fibrina ao redor do tumor é capaz de formar uma barreira protetora, limitando a progressão do tecido. Por outro lado, a fibrina depositada forma células tumorais metastáticas podendo auxiliar a disseminação dessas células (DEWYS et al., 1976). Anticoagulantes que removem a fibrina podem representar uma terapia efetiva. Um dos primeiros relatos do uso bem sucedido da enzima desfibrinante existente em um veneno foi realizado em 1973 (WOOD, HILGARD, 1973).

Muitos venenos de serpentes contém o “cobra venom factor” (CVF) que ativa e libera os componentes do sistema complemento dos mamíferos (EGGERTSEN et al., 1981). Esse fator é um análogo estrutural e funcional do fator complemento C3 existente no soro de mamíferos (VOGT, 1990). O CVF é usado como ferramenta no estudo de vários aspectos do sistema complemento, sendo um componente exclusivo do veneno que também é utilizado como agente imunossupressor em transplantes de órgãos e na terapia do câncer (VOGEL, 1987).

Muitos venenos apresentam atividade antimicrobiana e antiviral. Como exemplo, as L-aminoácido oxidases encontradas no veneno de *Pseudechis australis* que apresentaram ser mais eficientes *in vitro* que a tetraciclina, a droga utilizada em infecções por aeromonas (STILES et al., 1991). Outro estudo mostrou que a PLA2 e a L- aminoácido oxidase presentes no veneno de *Bothrops marajoensis* apresentaram efeitos antibacterianos e antiparasitários (COSTA TORRES et al., 2010). A atividade antiviral já foi comprovada, embora ainda não exista a comercialização dos compostos do veneno com essa propriedade. O veneno da serpente brasileira *Crotalus durissus terrificus* apresenta atividade contra o vírus do sarampo (PETRICEVICH, MENDONCA, 2003); a PLA2 encontrada no veneno de *Oxyuranus scutellatus* e *Naja mossambica* apresentaram potente atividade antiviral contra o vírus HIV-1 (FENARD et al., 1999).

A *miastenia gravis*, uma desordem crônica autoimune afeta 2 a cada 100.000 pessoas, é uma fraqueza progressiva dos músculos esqueléticos que resulta em fadiga rápida e perda da força. Essa doença afeta primeiramente a mastigação, os músculos faciais e da deglutição e, em casos avançados, os músculos respiratórios. Os anticorpos autoimunes destroem os receptores de acetilcolina nas junções neuromusculares, evitando os impulsos nervosos de cada um dos músculos. Um radioensaio rápido, quantitativo e sensível utilizando receptores humanos da acetilcolina, apresentou afinidade por uma neurotoxina purificada ( $\alpha$ -



bungarotoxina do veneno de *Bungarus multicinctus*) que é utilizada no diagnóstico dessa condição (VINCENT, 2002; CHU, 2005). Muitos venenos que apresentam  $\alpha$ -neurotoxinas são potenciais candidatos para essa finalidade.

Como observado anteriormente, a utilização dos compostos presentes nos venenos de serpentes para a elaboração de novas drogas aumentou muito nas últimas décadas, apesar do seu uso medicinal datar de tempos antigos. Com isso, se fazem importantes não só os estudos moleculares e farmacológicos dessas substâncias, como também os estudos relacionados à sistemática de serpentes e sua conservação no ambiente natural, visto que existe uma estrita relação entre uma espécie e as moléculas que compõem o veneno da mesma. Conhecendo-se mais as espécies, como habitat, dieta, relação filogenética com outros indivíduos, pode-se então investigar a composição farmacológica de seus venenos e, dessa forma, facilitar a obtenção de determinadas substâncias específicas, aumentando o potencial de utilização desses venenos e, conseqüentemente novas drogas e agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos.

Além disso, quando se buscam agentes terapêuticos contra doenças, primeiramente o interesse se volta para os venenos cujos sintomas do envenenamento envolvam os mesmos caminhos da doença, por exemplo, usando venenos que causem vasodilatação como potenciais reguladores da pressão sanguínea. Entretanto, os venenos de serpentes são muito complexos e contêm muitas isoformas diferentes, alguns dos quais presentes em baixas concentrações (VONK et al., 2011), como os fatores de crescimento de neural (KOSTIZA, MEIER, 1986). Além disso, os compostos que estão em baixas quantidades não necessariamente contribuem para a sintomatologia do envenenamento, podendo ser facilmente negligenciados, apesar do seu elevado potencial biomédico. Alternativamente, com o uso de ferramentas moleculares, o transcriptoma de glândulas de veneno pode ser explorado, refletindo diretamente a expressão dos genes. Utilizando essa abordagem, não apenas o perfil da expressão e a evolução das proteínas podem ser determinados (JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2006), como também proteínas com baixos níveis de expressão podem ser reveladas, expandindo a fonte de moléculas farmacologicamente ativas (VONK et al., 2011).

## 2. OBJETIVOS

O presente projeto teve como objetivo o fracionamento do veneno bruto de *Bothrops leucurus* por meio de técnicas cromatográficas, bem como, a caracterização de frações obtidas por métodos analíticos para comprovar algumas das propriedades bioquímicas do veneno dessa espécie e verificar as possíveis diferenças existentes entre os componentes do mesmo, comparando-os aos dados existentes na literatura.

## 3. MATERIAL E MÉTODOS

### 3.1. Preparação do veneno bruto

#### 3.1.1. Material

- 220 mg de veneno bruto liofilizado de *Bothrops leucurus* adquirido do serpentário SANMARU, Taquaral, SP;
- Tampão Tris-HCl 0,02 M + NaCl 0,15 M pH 8,0.

#### 3.1.2. Método

Inicialmente uma amostra do veneno bruto liofilizado foi hidratado com 1,5 ml do tampão Tris-HCl e centrifugada à 10.000 g por 10 minutos. Em seguida, foi reservado o sobrenadante límpido e descartado o pellet. O processo de fracionamento do veneno bruto em questão foi repetido duas vezes, utilizando-se 110 mg de veneno liofilizado em cada uma delas.

### 3.2. Separação inicial – Cromatografia de exclusão molecular

A cromatografia de exclusão molecular, também conhecida como cromatografia de filtração em gel, é utilizada nas etapas iniciais dos processos de purificação de proteínas e outras biomoléculas e para uma averiguação rápida sobre a composição proteica dos venenos

brutos. A coluna Sephacryl S-100 é caracterizada por separar as proteínas de acordo com a sua massa molecular e forma, sendo composta por uma matriz sintética, constituída por partículas porosas produzidas a partir dos polímeros alil dextrano e N, N '-metileno-bisacrilamida e com poros que variam na forma e tamanho. Ao ser aplicada uma mistura proteica (fase orgânica móvel), as proteínas de massa molecular menor penetram nos poros onde ficam retidas ou difundidas e as proteínas de massa maior passam livremente pela região intersticial da coluna. Com isso, as proteínas de massas moleculares maiores são eluídas primeiramente e as moléculas menores saem no final do processo de eluição, pois foram retidas nos poros (MORI, BARTH, 1999). A coluna utilizada é adequada para a purificação de peptídeos e proteínas de baixa massa molecular (1 a 100 kDa).

### *3.2.1. Material*

- Coluna Sephacryl S-100 Hiprep 16/60 (GE Healthcare);
- Coletor FRAC-920 (GE Healthcare);
- Sistema ÄKTA purifier HPLC (GE Healthcare);
- Tampão Tris-HCl 0,02 M + NaCl 0,15 M pH 8,0;
- Concentrador Amicon Ultra-15 de 3000 Da (Millipore).

### *3.2.2. Método*

O sobrenadante límpido (1,5 ml) foi aplicado na coluna de exclusão molecular Sephacryl S-100 previamente equilibrada com o tampão Tris-HCl. As proteínas foram eluídas com o mesmo tampão, utilizando-se um fluxo de 0,2 ml/min e frações de 1 ml/tubo, sendo a absorbância monitorada em 280 nm. Posteriormente, todas as frações resultantes da eluição foram analisadas em SDS-PAGE corado com nitrato de prata para averiguar a composição proteica de cada um dos picos.

## **3.3. Ensaio de purificação da fração PI da exclusão molecular**

Nessa etapa foi utilizada a cromatografia de troca iônica que separa proteínas e peptídeos de acordo com a sua carga. As colunas utilizadas apresentam grupos funcionais que se ligam às proteínas que possuem carga oposta. As moléculas ligadas são eluídas da coluna por deslocamento ao se aplicar uma concentração crescente de outra molécula similarmente

carregada, no caso o tampão de eluição. As proteínas têm inúmeros grupos funcionais que possuem cargas positivas e negativas que podem ser utilizados. Ao se ajustar o pH ou a concentração iônica da fase móvel (tampão), as proteínas podem ser separadas. A cromatografia de troca iônica é utilizada para a captura de proteínas alvo ou impurezas, como um processo intermediário de purificação ou uma etapa final de purificação com grande resolução (<http://www.gelifesciences.com>). A coluna de troca aniônica possui o ligante com carga positiva, permitindo a ligação de proteínas carregadas negativamente, sendo que as moléculas com interações iônicas mais fracas eluem primeiramente e as moléculas com interações mais fortes eluem posteriormente com o aumento da concentração do tampão de eluição.

### 3.3.1. *Material*

- Coluna de troca aniônica Mono Q 5/50 GL (GE Healthcare);
- Coletor FRAC-920 (GE Healthcare);
- Sistema ÄKTA purifier HPLC (GE Healthcare);
- Tampão A (tampão de ligação) – Tris-HCl 0,02 M + NaCl 0,15 M pH 8,0;
- Tampão B (tampão de eluição) – Tampão A + NaCl 1 M;
- Concentrador Amicon Ultra-15 de 3000 Da (Millipore).

### 3.3.2. *Método*

Após a primeira etapa cromatográfica (exclusão molecular) e análise por SDS-PAGE, foi feito um pool das frações coletadas no primeiro pico (PI), sendo então submetido ao processo de concentração utilizando-se o concentrador Amicon Ultra-15 de 3000 Da (Millipore) em temperatura de 18 °C, à 5000 g por aproximadamente 1 hora. O PI concentrado foi então aplicado na coluna de troca iônica Mono Q 5/50 GL, previamente equilibrada com o tampão A. Em seguida, deu-se o processo de eluição utilizando-se fluxo de 0,6ml/min e gradiente não linear de concentração do tampão B (0-100%), sendo coletados 1,5 ml por tubo.

Após a cromatografia, foi realizada a análise dos perfis proteicos de cada uma das frações eluídas por SDS-PAGE corado com nitrato de prata. Após a análise, o pico 4 (PI4) proveniente dessa etapa cromatográfica foi concentrado e recromatografado pelo mesmo processo de troca iônica e utilizando as mesmas condições.

### 3.4. Ensaio de purificação da fração PII da exclusão molecular

A cromatografia de afinidade é uma técnica cromatográfica que separa as proteínas (ou grupo de proteínas) por meio de uma ligação reversível entre a proteína alvo e a substância de ligação (ligante) acoplada à matriz ou coluna. Permite a purificação de uma biomolécula com base na sua função biológica ou estrutura química individual. As interações existentes entre o ligante e a molécula alvo pode ser resultado das interações eletrostáticas ou hidrofóbicas, forças de van der Waals e/ou ligações de hidrogênio. Para a eluição da proteína de interesse, a interação pode ser revertida especificamente utilizando-se um ligante competitivo ou não especificamente, alterando-se o pH, a força iônica ou polaridade (<https://www.gelifesciences.com>). A benzamidina é utilizada na purificação de serino proteinases e demais enzimas semelhantes à trombina por ser um inibidor competitivo e ligar-se de forma reversível ao sítio ativo dessas moléculas no processo de purificação.

#### 3.4.1. Material

- Resina Benzamidina Sepharose 4 Fast Flow (high sub) (GE Healthcare);
- Coluna XK 16/20 (16 mm i.d.);
- Coletor FRAC-920 (GE Healthcare);
- Sistema ÄKTA purifier HPLC (GE Healthcare);
- Tampão A (tampão de ligação) – Tris-HCl 0,02 M + NaCl 0,15 M pH 8,0;
- Tampão B (tampão de eluição 1) – Tampão A + NaCl 1M;
- Tampão glicina (tampão de eluição 2) – Glicina 0,05 M + NaCl 0,5 M pH 3,0;
- Tampão Tris 1 M pH 9,0;
- Concentrador Amicon Ultra -15 de 3000 Da (Millipore).

#### 3.4.2. Método

Inicialmente, foi feito um pool de todas as frações correspondentes ao PII que, posteriormente foi concentrado utilizando-se o concentrador Amicon Ultra -15 de 3000 Da (Millipore) em temperatura de 18 °C, à 5000 g por aproximadamente 1 hora para a remoção do excesso de tampão presente na amostra. Em seguida, a amostra concentrada foi aplicada na coluna XK 16/20 previamente empacotada com a resina Benzamidina e equilibrada com o tampão A.

As proteínas sem afinidade à benzamidina foram eluídas em um fluxo de 0,5 ml/min (tampão B) e coletadas em frações de 5 ml/tubo. As proteínas com afinidade à resina foram eluídas em tampão glicina e coletadas em frações de 1 ml/tubo no coletor FRAC-920, em um fluxo de 0,5 ml/min à temperatura ambiente. Às frações eluídas com o tampão glicina, foram adicionados 200 µl de tampão Tris 1 M pH 9,0. A adição do tampão Tris tem a finalidade de manter o pH estável, visto que o tampão glicina apresenta pH muito baixo para promover a liberação das ligações formadas entre a proteína e a benzamidina. Após a cromatografia, foi realizada a análise dos perfis proteicos de cada uma das frações eluídas por SDS-PAGE corado com nitrato de prata.

### **3.5. Ensaio de purificação das frações PIV, PV e PVI da exclusão molecular**

Nessa etapa foi utilizada a cromatografia de troca iônica, como descrito anteriormente, porém com coluna de troca catiônica, que possui o ligante com carga negativa, permitindo a ligação de proteínas carregadas positivamente, sendo que as moléculas com interações iônicas mais fracas eluem primeiramente e as moléculas com interações mais fortes eluem posteriormente com o aumento da concentração do tampão de eluição.

#### *3.5.1. Material*

- Coluna de troca catiônica Mono S 5/50 GL (GE Healthcare);
- Coletor FRAC-920 (GE Healthcare);
- Sistema ÄKTA purifier HPLC (GE Healthcare);
- Tampão A (tampão de ligação) – Acetato de sódio 0,02 M pH 5,6;
- Tampão B (tampão de eluição) – Tampão A + NaCl 1M;
- Concentrador Amicon Ultra -15 de 3000 Da (Millipore).

#### *3.5.2. Método*

Inicialmente, foi feito um pool com as frações correspondentes aos picos PIV, PV e PVI da cromatografia de exclusão molecular com Sephacryl S-100. Após a amostra ser concentrada em concentrador de 3000 Da, foi aplicada na coluna de troca iônica Mono S 5/50 previamente equilibrada com o tampão A. Em seguida, deu-se o processo de eluição utilizando-se fluxo de 0,6ml/min, frações de 1,5 ml/tubo e gradiente não linear de

concentração do tampão B (0-100%). Após a cromatografia, foi realizada a análise dos perfis proteicos de cada uma das frações eluídas por SDS-PAGE corado com nitrato de prata.

### **3.6. Caracterização bioquímica – Avaliação do grau de pureza e determinação da massa molecular relativa (Mr)**

A eletroforese em gel de poliacrilamida é uma ferramenta metodológica que possibilita a separação ou fracionamento de materiais de origem orgânica tal como proteínas, enzimas, DNA e RNA através de sua migração pelos dos poros do gel em resposta a um campo elétrico. No presente estudo, essa técnica foi utilizada para avaliar o grau de pureza e a massa molecular relativa das proteínas purificadas e também para averiguar a atividade fibrinogenolítica da serino e metalo proteinases. As eletroforeses na presença de SDS e agente desnaturante (SDS-PAGE) foram realizadas segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970) com algumas modificações. Os géis foram corados com nitrato de prata ou coomassie, que se diferem de acordo com o nível de sensibilidade: a coloração com nitrato de prata é capaz de detectar de 0,1 a 1,0 ng de proteína, enquanto a sensibilidade do Coomassie Brilliant Blue é de 100 ng de proteínas (PATTON, 2002).

#### *3.6.1. Material*

- Aparatos de eletroforese da GE Healthcare (cuba, suportes e placas de vidro) e da Bio-Rad (fonte);
- Solução gel separador 12% – 2.524 µl de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 1.577,50 µl de Tris-HCl pH 8,8; 63,1 µl de SDS a 10%; 2.110,65 µl de H<sub>2</sub>O deionizada, 60 µl de persulfato de amônio a 10% e 3,2 µl de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina);
- Solução gel separador 17% – 3.575,67 µl de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 1.577,50 µl de Tris-HCl pH 8,8; 63,1 µl de SDS a 10%; 1.058,98 µl de H<sub>2</sub>O deionizada, 60 µl de persulfato de amônio a 10% e 3,2 µl de TEMED (N, N, N', N'-tetrametiletilenediamina);
- Solução gel concentrador 4% – 333,3 µl de acrilamida 30%/bisacrilamida 0,8%; 625 µl de Tris-HCl pH 6,8; 25 µl de SDS a 10%; 1.501,7 µl de H<sub>2</sub>O deionizada; 30 µl de persulfato de amônio a 10% e 2,5 µl de TEMED;

- Tampão de amostra 3X – 25 ml de Tris-HCl/SDS pH 6,8 (Tris-HCl 0,5 M contendo SDS 0,4%), 20 ml de glicerol, 4 g de SDS, 1 mg de azul de bromofenol e  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e H<sub>2</sub>O deionizada para um volume final de 100 ml;
- Tampão de corrida (tampão do eletrodo) – 6,057 g de Tris; 28,8192 g de glicina; 2 g de SDS e 2 L de H<sub>2</sub>O;
- Padrões de peso molecular (GE Healthcare) – 97 kDa fosforilase b, 66 kDa albumina de soro bovino, 45 kDa ovalbumina, 30 kDa anidrase carbônica, 20.1 kDa inibidor da tripsina, 14.4 kDa  $\alpha$ -lactalbumina;
- Alíquotas para aplicação no gel – as quantidades de amostra e do tampão com  $\beta$ -mercaptoetanol variaram de acordo com a concentração de proteína presente em cada uma das frações resultantes da cromatografia (10 a 20  $\mu$ l/poço do gel);
- Coloração com coomassie:
  - Corante Coomassie Blue – metanol 50% (v/v); ácido acético 10% (v/v); coomassie blue 0.25% (v/v);
  - Descorante – metanol 50% (v/v).
- Coloração com nitrato de prata:
  - Solução fixadora – 30 ml de etanol; 10 ml de ácido acético e 60 ml de H<sub>2</sub>O;
  - Solução redutora – 250  $\mu$ l de glutaraldeído; 250  $\mu$ l de acetato de sódio 4M; 35 ml de etanol; 0,1 g de tiosulfato de sódio e 65 ml de H<sub>2</sub>O;
  - Solução com prata – 25  $\mu$ l de formaldeído (37%); 0,1 g de nitrato de prata e 100 ml de H<sub>2</sub>O;
  - Solução reveladora – 50  $\mu$ l de formaldeído (37%); 2,5 g de carbonato de sódio e 100 ml de H<sub>2</sub>O;
  - Solução de parada – ácido acético 50%;
- Espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) para medir a concentração de proteínas presentes nas amostras.

### 3.6.2. Método

As eletroforeses foram realizadas por um período de aproximadamente 3 horas, à temperatura ambiente, com corrente de 25 mA e voltagens de 100 V no gel concentrador e 150 V no gel separador. Após a corrida, os géis foram submetidos a um dos dois processos de coloração: coomassie, nos testes de atividade fibrinogenolítica e nitrato de prata para verificar a composição proteica e o grau de pureza das frações cromatográficas.



### 3.7. Caracterização enzimática – Atividade fibrinogenolítica

O teste em questão teve por finalidade averiguar a presença de atividade fibrinogenolítica dose-dependente e tempo-dependente da serino e metalo proteinases purificadas no presente estudo. A atividade fibrinogenolítica foi realizada com base na metodologia descrita por Edgar e Prentice (1973), porém foram feitas algumas modificações para melhor adequação das condições dos testes.

#### 3.7.1. Material

- Fibrinogênio bovino à concentração de 4,5 mg/ml;
- Metalo proteinases de 28 e 65 kDa;
- Serino protease;
- Tampão Tris-HCl – Tris 50 mM + NaCl 10 mM pH 7,4;
- Tampão de amostra 3X – 25 ml de Tris-HCl/SDS pH 6,8 (Tris-HCl 0,5 M contendo SDS 0,4%), 20 ml de glicerol, 4 g de SDS, 1 mg de azul de bromofenol e  $\beta$ -mercaptoetanol 5% e H<sub>2</sub>O para um volume final de 100 ml;
- Espectrofotômetro NanoVue (GE Healthcare Life Sciences) para medir a concentração de proteínas presentes nas amostras.

#### 3.7.2. Método

##### • Teste 1

Inicialmente, diferentes concentrações da serino e metalo proteinases purificadas foram encubadas na presença do fibrinogênio bovino (4,5 mg/ml) à temperatura de 37 °C pelo período de 120 minutos. As diferentes concentrações das enzimas, 0,05; 0,1; 0,2; 0,4; 0,8 e 1,0 mg/ml foram obtidas ao se diluir as mesmas no tampão Tris-HCl. Foram utilizados 10  $\mu$ l de enzima e 10  $\mu$ l de fibrinogênio em cada amostra, sendo feitos dois controles, um de fibrinogênio e outro com a enzima. Em seguida, a reação foi interrompida pela adição de 10  $\mu$ l de tampão da amostra contendo  $\beta$ -mercaptoetanol. Cada uma das amostras foi aplicada em gel de poliacrilamida corado com coomassie. A Tabela 1 apresenta as condições utilizadas no experimento.

**Tabela 1:** Condições utilizadas no teste de atividade fibrinogenolítica variando-se o fator concentração de proteína. CF= controle fibrinogênio; CP=controle proteína.

Amostra	Concentração Fibrinogênio (mg/ml)	Concentração Proteína (mg/ml)	Tempo incubação (min)
1 (CF)	4,5	-	120
2	4,5	0,05	120
3	4,5	0,1	120
4	4,5	0,2	120
5	4,5	0,4	120
6	4,5	0,6	120
7	4,5	0,8	120
8	4,5	1,0	120
9 (CP)	-	1,0	120

- **Teste 2**

O segundo teste consistiu em incubar as mesmas enzimas na concentração de 0,5 mg/ml com o fibrinogênio bovino (4,5 mg/ml) à 37 °C, alterando-se apenas os tempos de reação: 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos. Foram utilizados 10 µl de enzima e 10 µl de fibrinogênio em cada amostra, sendo feitos dois controles, um de fibrinogênio e outro com a enzima. A reação foi interrompida pela adição de 10 µl do tampão contendo β-mercaptoetanol. Cada uma das amostras foi aplicada em gel de poliacrilamida corado com coomassie. A Tabela 2 apresenta as condições utilizadas no experimento.

**Tabela 2:** Condições utilizadas no teste de atividade fibrinogenolítica variando-se o fator tempo de incubação. CF= controle fibrinogênio; CP=controle proteína.

Amostra	Concentração Fibrinogênio (mg/ml)	Concentração Proteína (mg/ml)	Tempo incubação (min)
1(CF)	4,5	-	60
2	4,5	0,5	15
3	4,5	0,5	30
4	4,5	0,5	45
5	4,5	0,5	60
6	4,5	0,5	90
7	4,5	0,5	120
8 (CP)	-	0,5	60

### 3.8. Caracterização Enzimática – Atividade proteolítica sobre a Caseína

O ensaio da atividade proteolítica sobre a caseína evidencia a clivagem desse substrato pelas proteinases purificadas e pelo veneno bruto de *Bothrops leucurus*. Esse método consiste

em incubar a enzima/veneno bruto na presença da caseína sob diferentes condições de pH para verificar em quais delas a atividade proteolítica é maior. Os experimentos foram realizados conforme o método proposto por Lomonte e Gutiérrez (1983) com algumas modificações.

### 3.8.1. *Material*

- Caseína (Sigma-Aldrich);
- Ácido Tricloroacético (TCA);
- Tampão Acetato de Sódio 0,02 M nos pHs 4,6 e 5,4;
- Tampão Cacodilato 0,02 M pH 6,2;
- Tampão Tris-HCl 0,02 M nos pHs 7,0; 8,0 e 8,6;
- Tampão Glicina-NaOH 0,02 M pH 10,2;
- Espectrofotômetro Spectronic Genesys 2 UV-Vis (Thermo Fischer Scientific).

### 3.8.2. *Método*

Inicialmente foram feitas diferentes soluções de caseína 1% (m/v) diluindo-se a mesma nos tampões com os pHs 4,6–10,2. As metalo proteinases e serino protease purificadas, juntamente com o veneno bruto, foram incubados com as soluções de caseína à 37 °C por 30 minutos, sendo a reação interrompida pela adição de TCA 5% (m/v). Foi utilizada uma proporção de 10 µl de enzima (concentração de 1 mg/ml) para 100 µl da solução de caseína 1% e 300 µl de TCA 5% para interromper a reação.

Em seguida, as amostras foram deixadas em repouso por um período de 30 minutos e, então, centrifugadas por 10 minutos à 10.000 g, sendo retirado o sobrenadante e descartado o pellet. Como a caseína não hidrolisada precipita com a adição de ácido tricloroacético, a medição da atividade caseinolítica em absorbância 280 nm, se deu pelos peptídeos resultantes da clivagem presentes no sobrenadante. O controle da reação consistiu em incubar a solução de caseína sem as enzimas à 37 °C por 30 minutos. Os testes foram realizados em triplicata e calculados a média dos valores da absorbância e o desvio padrão, sendo então plotados em gráficos para comparação. A atividade proteolítica sobre a caseína foi expressa em unidades caseinolíticas por miligrama de enzima (U/mg), sendo calculada pela equação

$$\frac{U}{mg} = \frac{Abs}{mg} \times 100$$

em que Abs representa a absorvância 280 nm e mg a concentração do veneno utilizada em mg/ml.

### 3.9. Ensaio antimicrobiano do veneno bruto – Mínima Concentração Inibitória (MIC)

A mínima concentração inibitória (MIC) é definida como a menor concentração de um antimicrobiano capaz de inibir visualmente o crescimento de um microrganismo após incubação overnight. É um teste utilizado para confirmar a resistência ou a atividade *in vitro* de compostos antimicrobianos (ANDREWS, 2001). Para a realização desse teste faz-se necessária a utilização de linhagens ATCC (American Type Culture Collection), que representa um centro de recursos biológicos sem fins lucrativos voltado para a aquisição, autenticação, produção, preservação, desenvolvimento e distribuição de microrganismos padrão de referência, linhagens celulares e outros materiais para pesquisa médica e biológica (<http://www.atcc.org>).

Sabe-se que os venenos de serpentes apresentam atividade antimicrobiana, com isso, foi realizado o teste de mínima concentração inibitória do veneno bruto de *Bothrops leucurus* em duas linhagens de microrganismos, a *Escherichia coli*, uma bactéria Gram-negativa e o *Staphylococcus aureus*, uma Gram-positiva. Os testes foram realizados em triplicata conforme a metodologia padrão descrita pelo CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute) (CLSI, 2012).

#### 3.9.1. Material

- Veneno bruto de *Bothrops leucurus*;
- Linhagens microbianas de *Escherichia Coli* (ATCC 25922) e *Staphylococcus aureus* (ATCC 25923);
- Placas de microtitulação de 96 poços;
- Tampão fosfato-salino (PBS) pH 7,4;
- Meio de cultura Mueller-Hinton (Himedia);
- Solução de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1%;
- Solução de BaCl<sub>2</sub> a 1,175%;
- Antibiótico cloranfenicol (CAN) na concentração de 34 mg/ml;
- Cloreto de 2,3,5-Trifenil Tetrazólio (TTC) (Sigma Aldrich).

### 3.9.2. Método

- **Preparação do veneno bruto e do cloranfenicol**

Inicialmente foi realizada uma série de diluições do veneno bruto de *Bothrops leucurus* (4–1024 µg/ml) e do cloranfenicol (0,625–160 µg/ml) utilizando-se tampão PBS estéril. As diluições utilizadas são consideradas padrão de acordo com o CLSI para o teste de mínima concentração inibitória. O antibiótico em questão foi empregado como controle positivo dos ensaios.

- **Preparação do meio de cultura e microrganismos**

O ágar Mueller-Hinton é um meio de cultura microbiológico ideal para o uso em testes de susceptibilidade antimicrobiana utilizando-se enterobactérias. É constituído por infusão de carne (30%), caseína hidrolisada (1,75%), amido (0,15%) e ágar (1,7%). O preparo do meio de cultura utilizado consistiu em dissolver 21 g do ágar em 1000 ml de água deionizada, sendo posteriormente autoclavado por 15 minutos. Os microrganismos, *E. coli* e *S. aureus*, inicialmente mantidos em freezer à temperatura de -80 °C, foram inoculados no meio de cultura líquido e mantidos em estufa à 37 °C overnight em condições de aerobiose para permitir o crescimento.

- **Ajuste da turbidez de acordo com a escala de McFarland**

Para o ajuste da turbidez e intensidade da multiplicação dos microrganismos nos meios de cultivo líquidos foi utilizada a escala de McFarland. Para a preparação da solução-padrão da escala de McFarland, foram utilizados 0,05 ml de BaCl<sub>2</sub> a 1,175% e 9,95 ml de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 1% e mantidos sob agitação lenta até total homogeneização. Essa solução corresponde ao padrão 0,5 da escala que apresenta turbidez aproximada de 1,5 x 10<sup>8</sup> unidades formadoras de colônias (UFC/ml). Para a utilização no teste de mínima concentração inibitória, a turbidez da suspensão de microrganismos foi ajustada por comparação visual ao precipitado de sulfato de bário pela adição de meio líquido estéril.

- **Teste da mínima concentração inibitória**

Para os testes com o veneno bruto, adicionou-se em cada um dos poços da placa de microtitulação 50 µl do veneno nas diferentes diluições juntamente com 50 µl da suspensão de microrganismos previamente ajustada à escala de McFarland. Para os controles positivos com cloranfenicol, foi feito o mesmo processo. Como controle negativo, foi utilizado o tampão PBS pH 7,4 e o meio de cultura Mueller Hinton sem o veneno e os microrganismos. A placa contendo as diferentes amostras foi então encubada overnight à 37 °C em condições de aerobiose. Como o volume de

veneno/cloranfenicol é o mesmo da suspensão de microrganismos, considera-se que a concentração inicial é reduzida pela metade. A Tabela 3 apresenta as concentrações (em  $\mu\text{g/ml}$ ) finais de cada uma das amostras após a adição do meio de cultura contendo os microrganismos.

**Tabela 3:** Concentrações do veneno bruto e do cloranfenicol utilizadas no teste MIC após a adição do meio de cultura contendo a suspensão de microrganismos.

<b>Amostra</b>	<b>Concentração veneno bruto (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>	<b>Concentração CAN (<math>\mu\text{g/ml}</math>)</b>
1	2	0,312
2	4	0,625
3	8	1,25
4	16	2,5
5	32	5
6	64	10
7	128	20
8	256	40
9	512	80

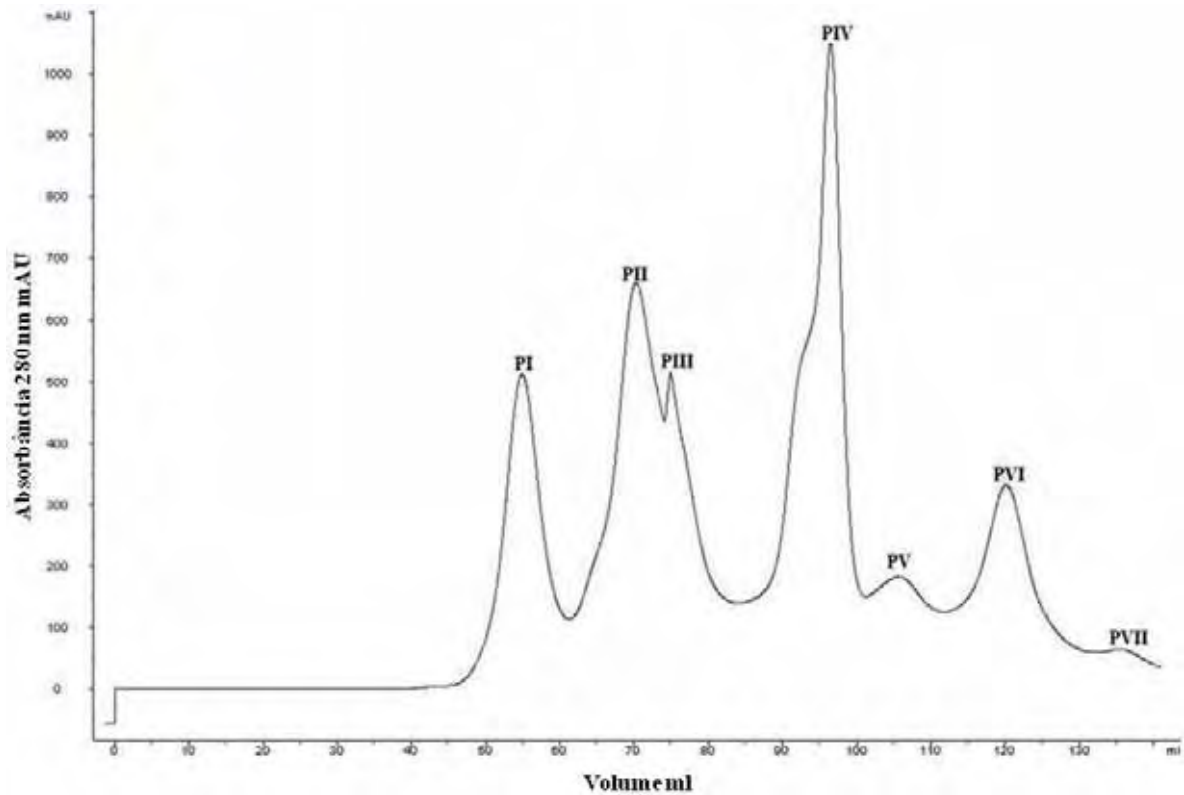
Após a incubação overnight à  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$ , foram adicionados  $5\ \mu\text{l}$  de TTC a cada um dos poços correspondentes às amostras e então, a placa foi novamente levada à estufa em temperatura de  $37\text{ }^{\circ}\text{C}$  por um período de 2 horas. A análise dos poços foi realizada visualmente pela mudança de coloração promovida pela adição do TTC a 1%. Essa substância reflete a atividade das enzimas desidrogenases relacionadas com os processos de fosforilação oxidativa proveniente do metabolismo microbiano (BENITEZ et al., 1999). Sua atividade é verificada principalmente na redução do cloreto de trifênil tetrazólio a trifênil formazan (TFP), que se caracteriza por ser um composto insolúvel em água de coloração rósea, podendo assim ser quantificado visualmente (TREVORS, 1984).

## 4. RESULTADOS

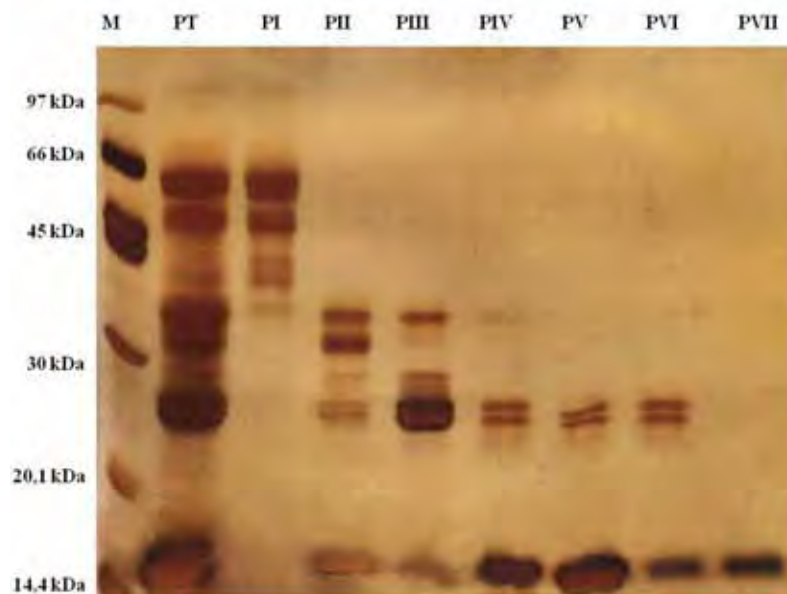
### 4.1. Separação Inicial – Cromatografia de Exclusão Molecular

A cromatografia de exclusão molecular do veneno bruto de *Bothrops leucurus* originou um cromatograma com sete picos, PI a PVII (Figura 1). Pode-se observar que o quarto pico, PIV, apresentou o maior valor em unidade de absorvância (mAU) à 280 nm, (aproximadamente 1.100 mAU), enquanto o pico PVII apresentou a menor concentração (aproximadamente 80 mAU). A unidade de absorvância é proporcional à quantidade de proteína existente em cada uma das amostras, pois quantifica os aminoácidos aromáticos (Phe, Tyr e Trp) presentes em proteínas enoveladas, visto que estes absorvem a luz na faixa de 280 nm.

Posteriormente foi realizada a análise por SDS-PAGE desses picos para averiguar o perfil proteico de cada um deles (Figura 2). O PVII apresentou uma única banda, indicando uma proteína pura de massa molecular de 15 kDa, sendo possivelmente uma fosfolipase.



**Figura 1:** Cromatograma resultante da cromatografia de exclusão molecular do veneno bruto de *Bothrops leucurus*. Pode-se observar um perfil formado por sete picos: PI, PII, PIII, PIV, PV, PVI e PVII. A concentração de proteína existente em cada pico é representada por unidade de absorvância (mAU).



**Figura 2:** SDS-PAGE corado com nitrato de prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de exclusão molecular. M= marcador molecular em kDa; PT= proteína total (veneno bruto de *Bothrops leucurus*); PI-PVII= perfil proteico de cada pico resultante da cromatografia.

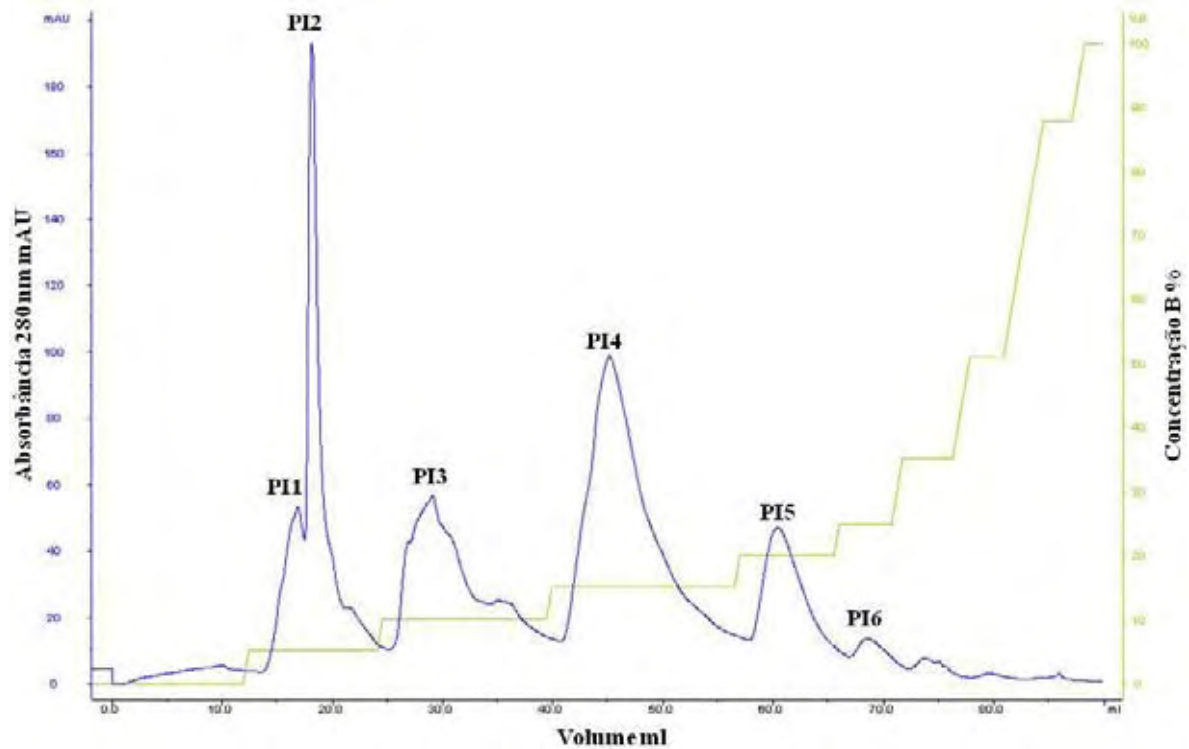


#### 4.2. Ensaio de purificação da fração PI da exclusão molecular

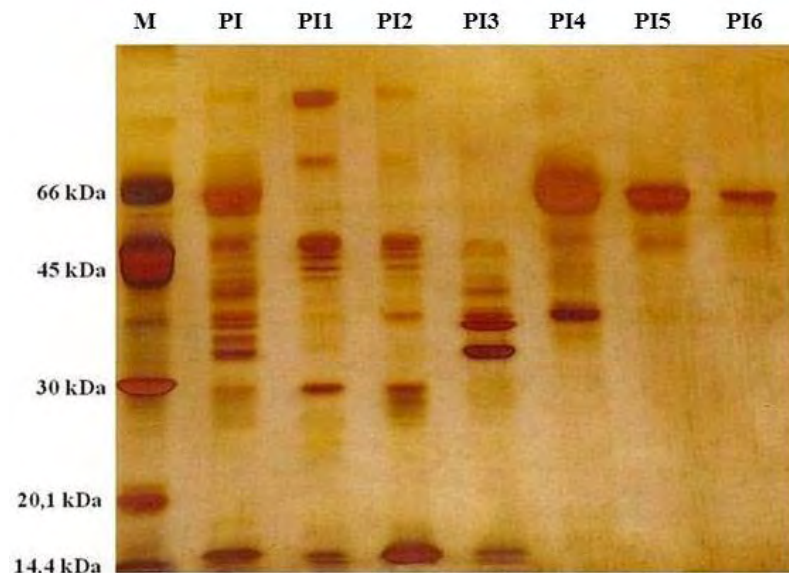
O PI resultante da cromatografia de exclusão molecular após ser concentrado apresentou coloração amarelada, indicando a existência da enzima L-aminoácido oxidase. A LAAO confere essa coloração típica ao veneno bruto liofilizado, sendo que, ao ser isolada no primeiro pico da exclusão molecular, as demais frações (PII-PVII) apresentaram aspecto incolor. Então, a coloração é uma forma de identificar a presença dessa proteína.

O cromatograma resultante (Figura 3) apresenta seis picos, PI1, PI2, PI3, PI4, PI5 e PI6. Pode-se observar que todas as proteínas presentes na amostra se ligaram à coluna, pois não houve um aumento considerável em unidades de absorvância (mAU) antes do processo de eluição. As proteínas começaram a ser eluídas à concentração de 5% de NaCl (picos PI1 e PI2). O PI2 apresentou a maior concentração proteica de acordo com o valor de mAU.

Foi realizada a análise por SDS-PAGE (coloração com nitrato de prata) para verificar a composição proteica de cada uma das frações obtidas na cromatografia (Figura 4). Pode-se observar que nos picos PI5 e PI6 apareceu uma banda no gel com massa molecular de 65 kDa, indicando a presença de proteína pura (metalo protease). No PI4 observa-se a presença de duas bandas muito próximas com massas moleculares semelhantes e o eluído correspondente apresentou coloração amarelada, indicando que uma dessas proteínas corresponde à LAAO.



**Figura 3:** Cromatograma resultante da cromatografia de troca aniônica do PI da exclusão molecular. Pode-se observar um perfil formado por seis picos: PI1, PI2, PI3, PI4, PI5 e PI6. A linha azul indica a concentração de proteína existente em cada pico que é representada por unidade de absorbância mAU; a linha verde indica o gradiente de concentração do tampão contendo NaCl (tampão de eluição).

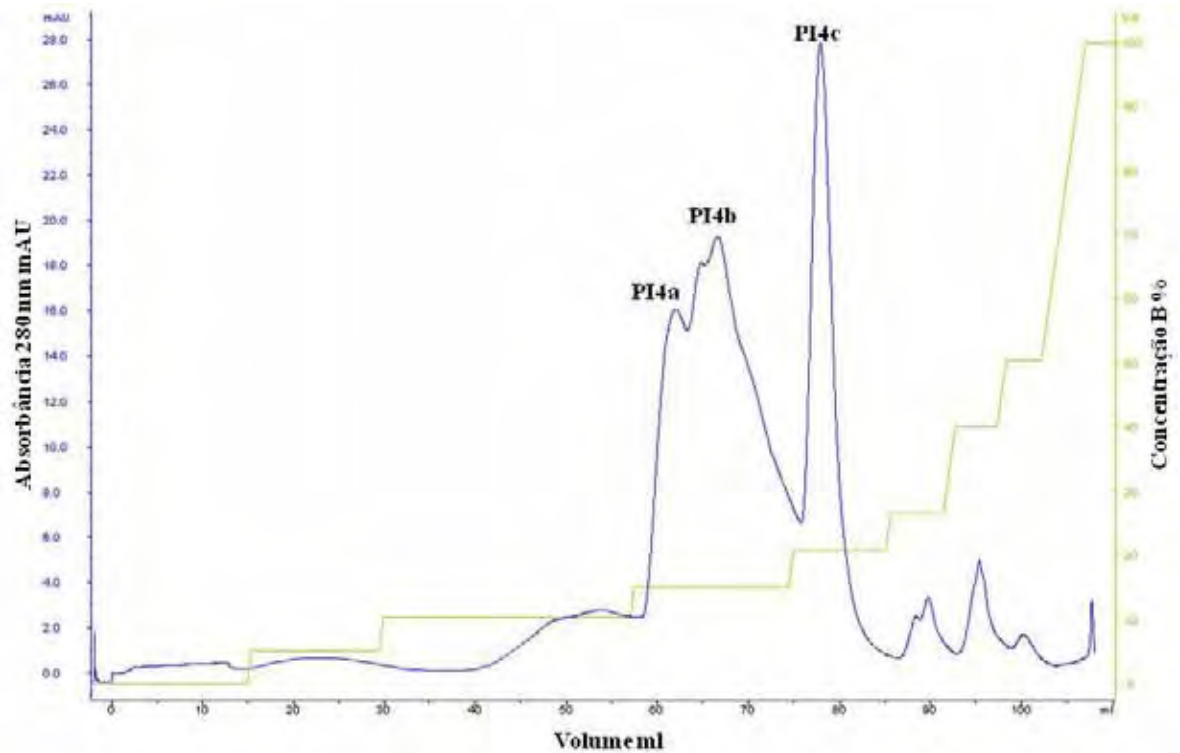


**Figura 4:** SDS-PAGE em coloração prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de troca aniônica do PI. M= marcador molecular em kDa; PI= pico I da exclusão molecular. PI1-PI6= perfil proteico de cada fração resultante da cromatografia.

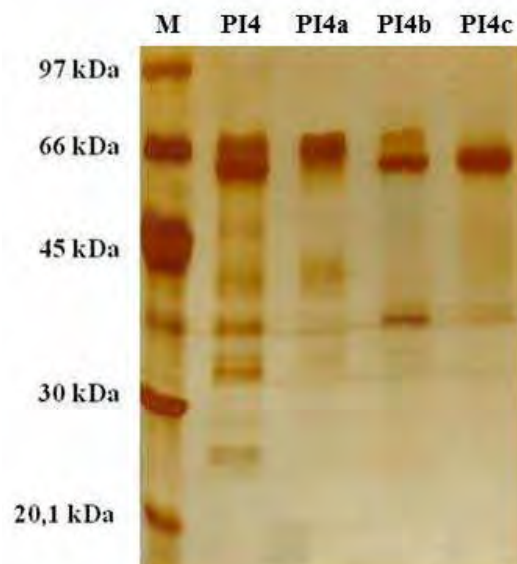
Para separar as proteínas de massas moleculares próximas presentes no PI4 foi realizada outra etapa cromatográfica com a mesma coluna de troca aniônica, Mono Q 5/50 GL, utilizando-se os mesmos tampões de ligação e de eluição, juntamente com a mesma taxa de fluxo e frações coletadas por tubo. O cromatograma resultante apresenta apenas três picos (PI4a, PI4b e PI4c), em que todas as proteínas se ligaram à coluna e iniciando a eluição a partir de uma concentração de 15% do tampão B (Figura 5).

Posteriormente foi realizada a análise por SDS-PAGE corado com nitrato de prata para verificar se houve a separação das bandas com massas moleculares próximas. Observa-se no gel que ocorreu a separação dessas bandas, sendo que o poço correspondente ao pico PI4a apresenta a banda referente à proteína com massa molecular maior (66 kDa) e os poços PI4b e PI4c apresentam uma banda correspondente à proteína de massa molecular de aproximadamente 65 kDa (Figura 6). O poço PI4b apresentou uma banda contaminante de massa molecular menor (aproximadamente 35 kDa)..

A proteína purificada com massa molecular de 66 kDa trata-se da L-aminoácido oxidase. Isso foi comprovado ao ser feito um pool com as alíquotas purificadas e concentrando-o, sendo que após a concentração, percebeu-se nitidamente a coloração amarelada típica dessa proteína, ao passo que as frações com massa de 65 kDa permaneceram incolores, sendo inicialmente classificadas como uma metalo protease.



**Figura 5:** Cromatograma resultante da cromatografia de troca aniônica do PI4. Pode-se observar um perfil formado por três picos: PI4a, PI4 b e PI4c. A linha azul indica a concentração de proteína existente em cada pico que é representada por unidade de absorvância mAU; a linha verde indica o gradiente de concentração do tampão contendo NaCl (tampão de eluição).



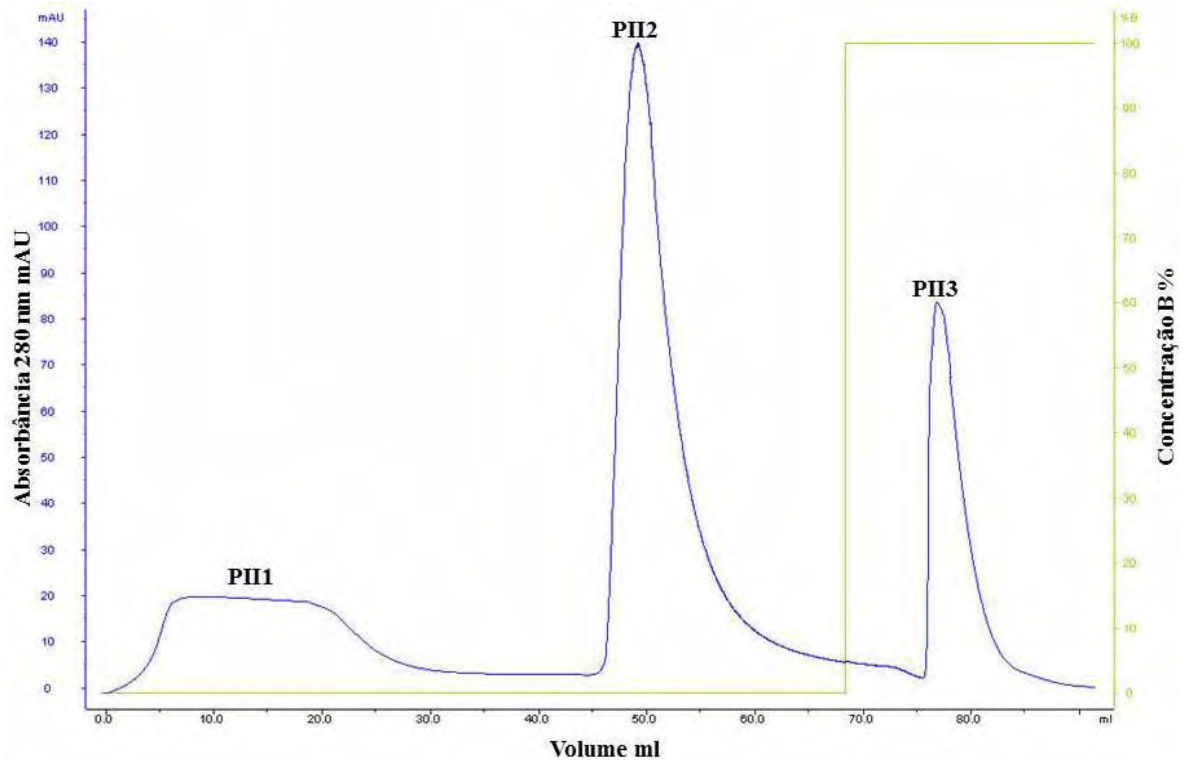
**Figura 6:** SDS-PAGE em coloração prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de troca aniônica do PI4. M= marcador molecular em kDa; PI4= proteína total. PI4a-PI4c= perfil proteico de cada pico resultante da cromatografia.

### 4.3. Ensaio de purificação da fração PII da exclusão molecular

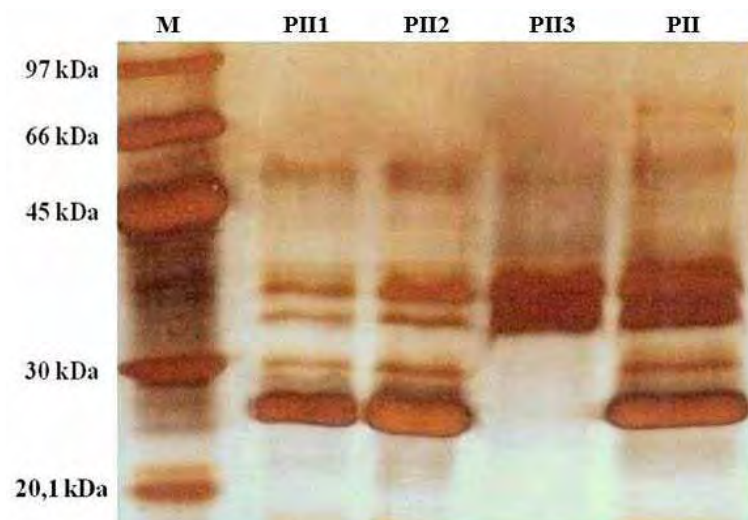
O PII resultante da cromatografia de exclusão molecular foi aplicado na resina de afinidade à Benzamidina. O cromatograma resultante apresentou três picos (Figura 7): PII1 e PII2, que correspondem à fração proteica não ligada à benzamidina (sem afinidade) e o PII3 que corresponde à fração proteica com afinidade à benzamidina que foi eluído com o tampão glicina.

Para verificar a composição proteica das frações foi realizado o SDS-PAGE corado com nitrato de prata (Figura 8). O PII3, o pico com afinidade à benzamidina, apresentou duas bandas de massas moleculares muito próximas: uma superior, com massa de 38 kDa e uma banda inferior, com massa de aproximadamente 35 kDa. Observou-se que nos picos PII1 e PII2, que correspondem às proteínas sem afinidade à resina, também apareceram as bandas de 35 e 38 kDa, porém em menor intensidade. Isso ocorre, pois os processos de purificação não apresentam um rendimento de 100%, sendo que algumas proteínas, mesmo com afinidade à resina, passam diretamente pela região intersticial da coluna sem ocorrer a ligação.

Após a cromatografia de afinidade à benzamidina, foram realizados outros ensaios cromatográficos utilizando-se o PII3 na tentativa de separar essas proteínas com massas moleculares próximas. Foram realizadas cromatografias de troca aniônica e catiônica, alterando-se os tampões de ligação e eluição (tampão acetato de sódio pH 5,4). Entretanto, ao analisar os perfis cromatográficos por SDS-PAGE (dados não mostrados), verificou-se que as proteínas com massas moleculares próximas não puderam ser separadas.



**Figura 7:** Cromatograma resultante da cromatografia de afinidade à benzamidina do PII. Pode-se observar o perfil característico da cromatografia de afinidade, que é formado por três picos, PII1, PII2 e PII3. Os picos PII1 e PII2 apresentam as frações que não apresentaram afinidade à benzamidina. O pico PII3 apresenta a proteína com afinidade à mesma. A linha azul indica a concentração de proteína existente em cada pico que é representada por unidade de absorbância mAU; a linha verde indica a concentração do tampão glicina.



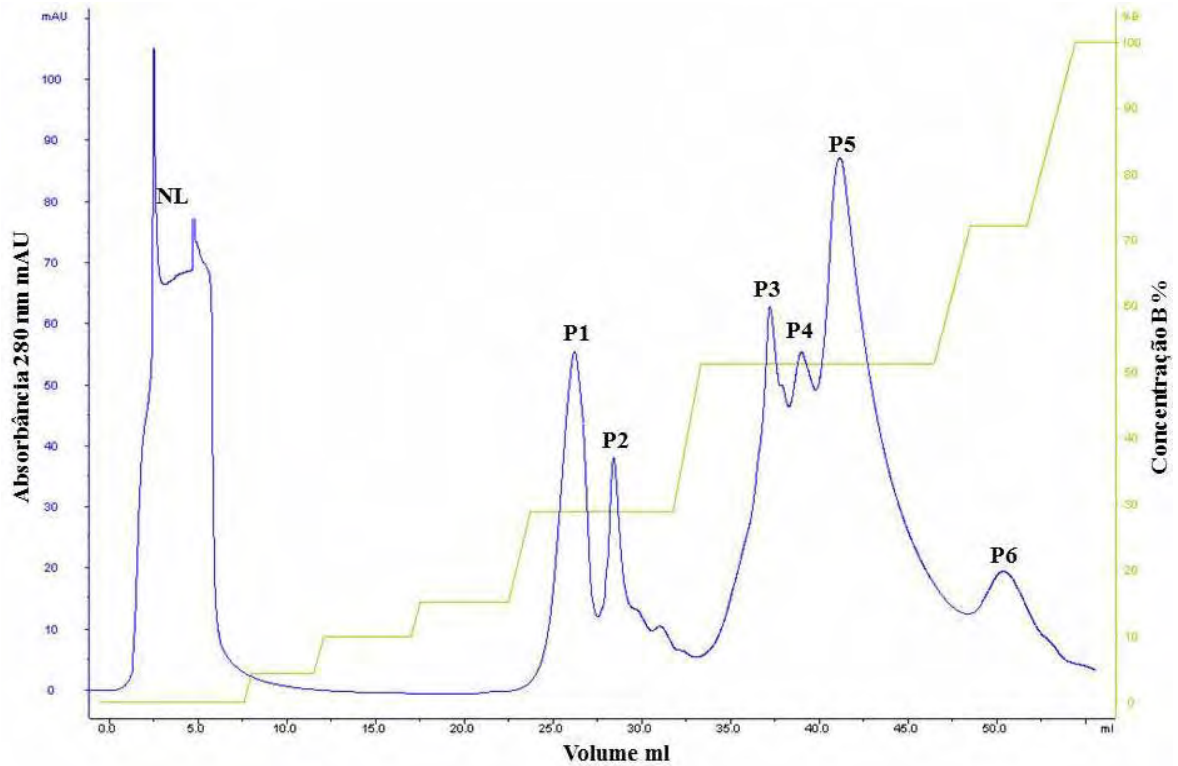
**Figura 8:** SDS-PAGE em coloração prata correspondente aos picos resultantes da cromatografia de afinidade à benzamidina. M= marcador molecular em kDa; PII= pico II da exclusão molecular. O poço PII3 corresponde à fração com afinidade à benzamidina.

#### **4.4. Ensaio de purificação das frações PIV, PV e PVI da exclusão molecular**

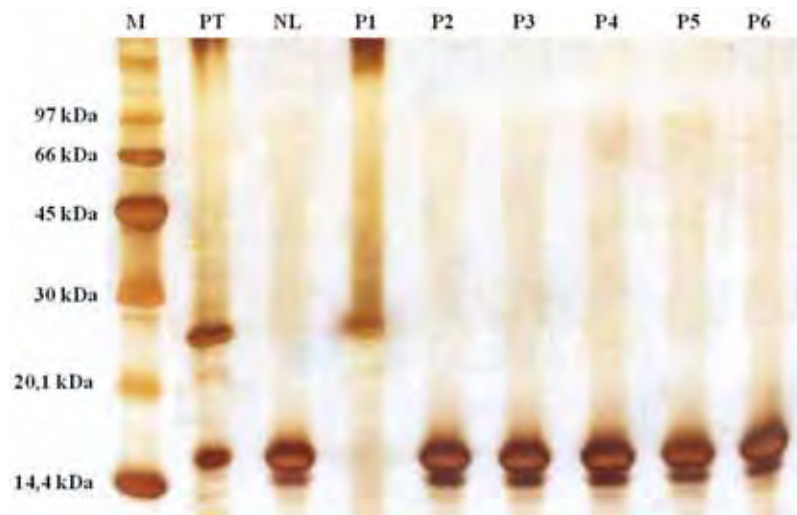
O cromatograma resultante da cromatografia de troca catiônica (Figura 9) apresentou, além de um pico constituído por proteínas que não se ligaram à coluna (NL), seis picos (P1-P6) durante o processo de eluição.

De acordo com o SDS-PAGE corado com nitrato de prata realizado com as frações do cromatograma (Figura 10), pode-se observar que ocorreu a separação das proteínas que estavam presentes nos picos PIV, PV e PVI da exclusão molecular. A fração não ligada à coluna, NL, e os picos P2-P6 apresentam duas bandas com massas moleculares de 14 e 15 kDa, sugerindo serem duas fosfolipases. O P1 apresentou duas bandas muito próximas com massa molecular de aproximadamente 28 kDa.

Foram realizados testes cromatográficos adicionais no PI alterando-se o tipo de coluna utilizada e as condições de pH na tentativa de separar as bandas de 28 kDa, porém, as mesmas não foram purificadas podendo indicar que são isoformas da mesma proteína (metalo protease).



**Figura 9:** Cromatograma resultante da cromatografia de troca catiônica dos picos PIV, PV e PVI. NL= fração proteica não ligada à coluna; P1-P6= picos resultantes do processo de eluição. A linha azul indica a concentração de proteína existente em cada pico que é representada por unidade de absorvância mAU; a linha verde indica a concentração do tampão com NaCl (tampão de eluição).



**Figura 10:** SDS-PAGE em coloração prata correspondente às frações resultantes da cromatografia de troca catiônica dos picos PIV, PV e PVI. M= marcador molecular em kDa; PT= proteína total (PIV, PV e PVI); NL= fração proteica que não se ligou à coluna; P1-P6= frações resultantes do processo de eluição.

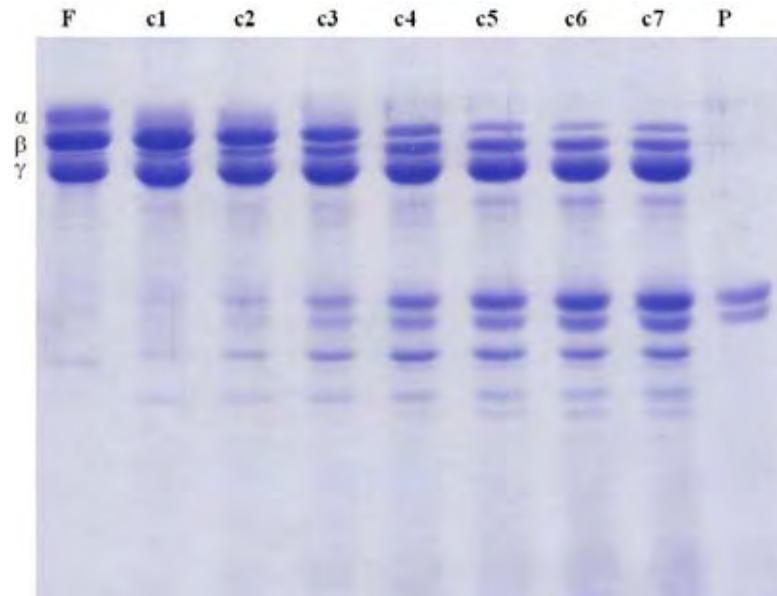


## 4.5. Atividade Fibrinogenolítica

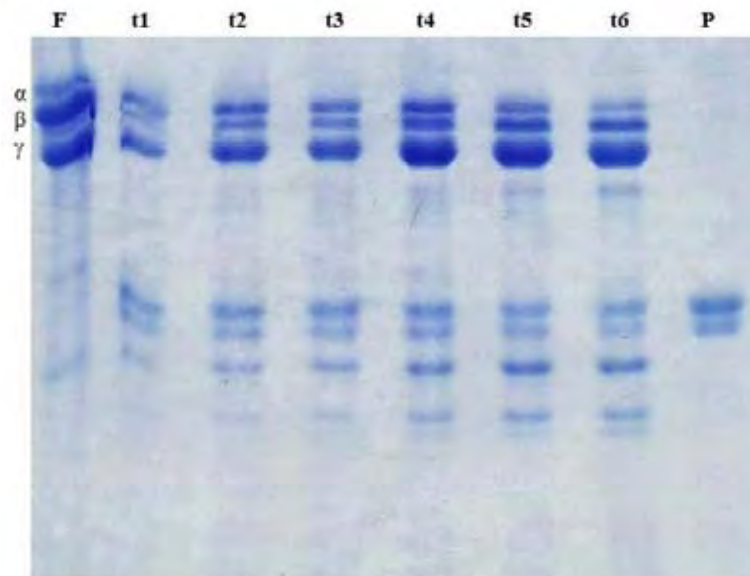
### 4.5.1. Atividade fibrinogenolítica da Serino Protease

De acordo com o primeiro teste, pode-se verificar que ocorreu atividade fibrinogenolítica (Figura 11) em todas as concentrações utilizadas de serino protease sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. Com relação à cadeia  $\beta$ , nas menores concentrações da enzima 0,05; 0,1 e 0,2 mg/ml (poços c1, c2 e c3 do gel) não ocorreu ou ocorreu atividade muito baixa, sendo que esta tornou-se mais eficiente nas concentrações de 0,4; 0,6; 0,8 e 1,0 mg/ml (poços c4-c7). Não ocorreu atividade sobre a cadeia  $\gamma$  em nenhuma das amostras. Observa-se no gel, logo abaixo das cadeias do fibrinogênio, algumas bandas de massas moleculares menores, indicando a presença de peptídeos resultantes da digestão das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio.

No segundo teste realizado com a serinoprotease (Figura 12), pode-se observar que no tempo de incubação equivalente a 15 minutos (t1) ocorreu a maior atividade, seguido do tempo de 30 e 45 minutos (t2 e t3), sendo que nas demais amostras (t4-t6) a atividade foi menor e manteve-se constante mesmo com o aumento do tempo de incubação. A cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio foi totalmente degradada e a cadeia  $\beta$  foi parcialmente hidrolisada em todas as amostras.



**Figura 11:** SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da serino protease variando-se o fator concentração de proteína. F= controle fibrinogênio indicando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; P= controle serinoprotease. Os poços c1-c7 indicam as diferentes concentrações utilizadas de proteína. Observa-se que em todas as amostras houve atividade sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. Houve maior atividade sobre a cadeia  $\beta$  nas amostras c4-c7 e ausência de atividade sobre a cadeia  $\gamma$  em todas as amostras.



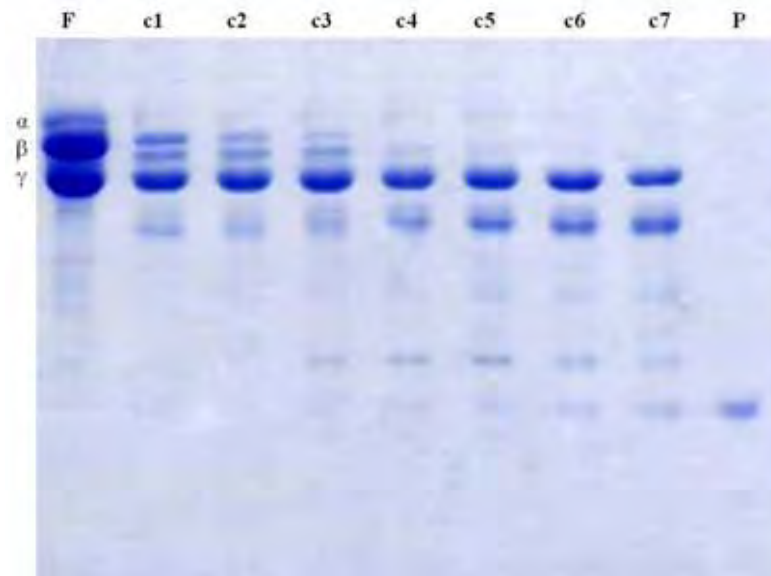
**Figura 12:** SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da serino protease variando-se o fator tempo de incubação. F= controle fibrinogênio indicando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; P= controle serinoprotease. Os poços t1-t6 indicam os diferentes tempos de incubação testados. Observa-se que em todas as amostras houve atividade sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio e sobre a cadeia  $\beta$  em menor intensidade. A atividade foi mais significativa no tempo de 15 minutos (t1).

#### 4.5.2. Atividade fibrinogenolítica da Metallo Protease de 28 kDa

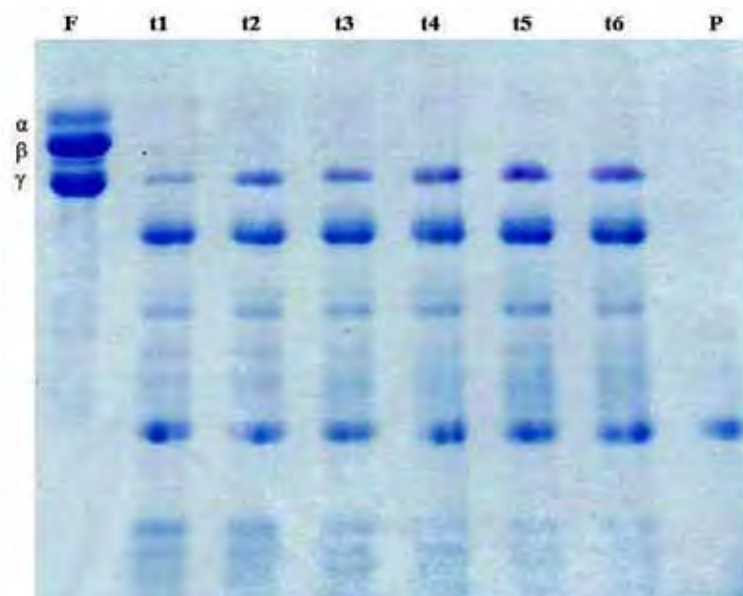
De acordo com o SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue do primeiro teste com a metallo protease de 28 kDa (Figura 13), observa-se que ocorreu atividade sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio em todas as amostras testadas; leve atividade sobre a cadeia  $\beta$  nas concentrações de proteína de 0,1; 0,2 e 0,4 mg/ml (c1, c2 e c3) e intensa atividade sobre essa mesma cadeia nas demais amostras (c4, c5, c6 e c7). Também houve atividade sobre a cadeia  $\gamma$  nas amostras c5-c7, sendo mais intensa na concentração de 1 mg/ml.

O segundo teste em que se variou o tempo de incubação das amostras, pode-se perceber pela análise do SDS-PAGE (Figura 14) que ocorreu total hidrólise das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$  em todos os tempos testados 15, 30, 45, 60, 90 e 120 minutos e que a digestão da cadeia  $\gamma$  foi mais intensa no tempo de 15 minutos (t1). Em comparação com a atividade fibrinogenolítica da serino protease (Figuras 11 e 12), observou-se que a metallo protease de 28 kDa apresenta maior eficiência em ambos os experimentos.

As bandas que aparecem nos géis (Figuras 13 e 14) com massas moleculares logo abaixo da cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio são peptídeos resultantes hidrólise das cadeias do fibrinogênio, indicando que houve atividade enzimática.



**Figura 13:** SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 28 kDa variando-se o fator concentração de proteína. F= controle fibrinogênio indicando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; P= controle metalo protease. Os poços c1-c7 indicam as diferentes concentrações utilizadas de proteína. Observa-se que em todas as amostras houve atividade sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. Houve maior atividade sobre a cadeia  $\beta$  nas amostras c4-c7 e presença de atividade sobre a cadeia  $\gamma$  nas amostras c5-c7.

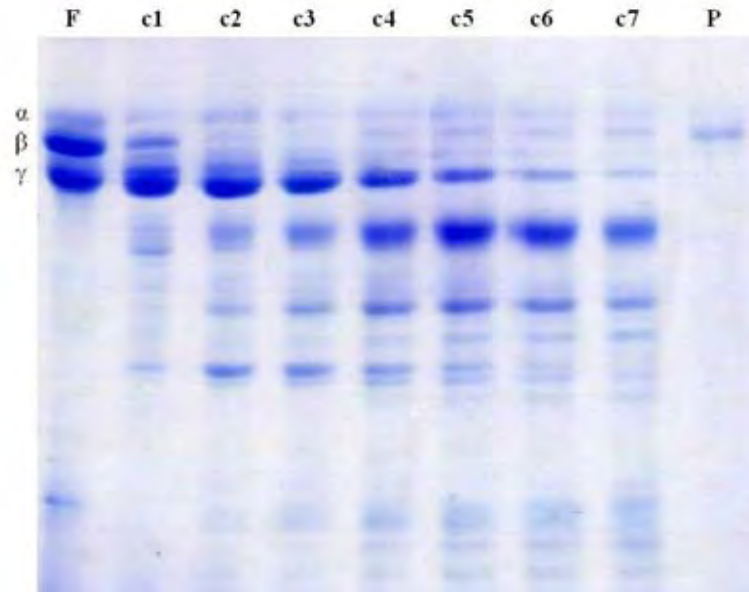


**Figura 14:** SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 28 kDa variando-se o fator tempo de incubação. F= controle fibrinogênio indicando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; P= controle metalo protease. Os poços t1-t6 indicam os diferentes tempos de incubação testados. Observa-se que em todas as amostras houve atividade sobre a cadeia  $\alpha$  e  $\beta$  do fibrinogênio e atividade mais intensa sobre a cadeia  $\gamma$  no tempo de 15 minutos (t1).

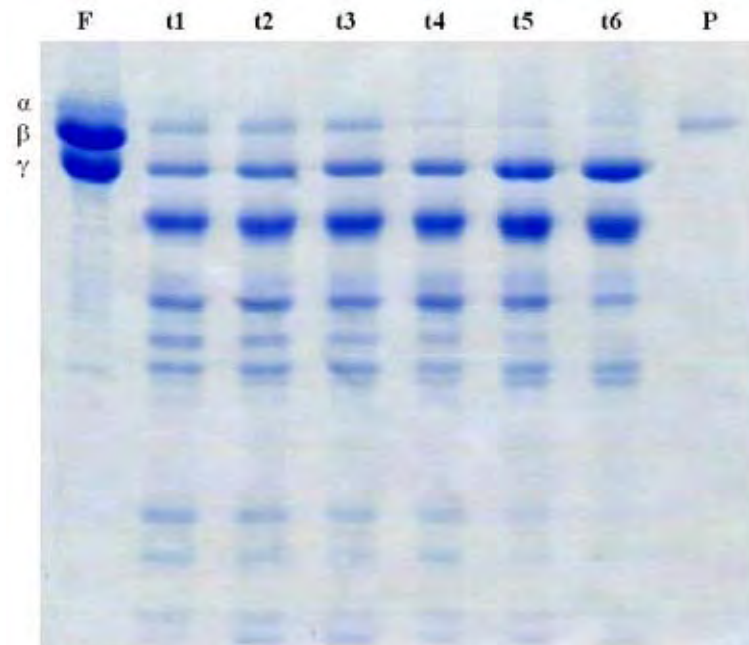
#### 4.5.3. Atividade fibrinogenolítica da Metallo Protease de 65 kDa

No primeiro teste, em que se alterou apenas a concentração da enzima, mantendo-se a concentração do fibrinogênio e tempo de incubação constantes, pode-se observar no gel (Figura 15) que na concentração de 0,05 mg/ml (c1) ocorreu a digestão total da cadeia  $\alpha$  e parcial da cadeia  $\beta$ . Nas concentrações de 0,1; 0,2; 0,4; 0,6 e 0,8 mg/ml (c2-c6) ocorreu a hidrólise total das cadeias  $\alpha$  e  $\beta$ , com degradação parcial da cadeia  $\gamma$ , sendo que nesta última, a atividade foi aumentando progressivamente com o aumento da concentração da proteína. No poço c7 do gel, correspondente à concentração de 1 mg/ml, observa-se que a banda  $\gamma$  do fibrinogênio sofreu praticamente hidrólise completa, mostrando que a concentração dessa metalo protease tem grande influência na atividade fibrinogenolítica.

No segundo experimento, em que foram testados diferentes tempos de incubação, mantendo-se as concentrações de fibrinogênio e proteína constantes, observou-se na análise por SDS-PAGE (Figura 16) que a digestão da cadeia  $\alpha$  ocorreu em todas as amostras e a hidrólise da cadeia  $\beta$  foi mais intensa nos tempos de incubação de 60, 90 e 120 minutos (t4-t6). Com relação à cadeia  $\gamma$ , observou-se que sua maior hidrólise ocorreu nos tempos que variaram de 15 a 60 minutos de incubação (t1-t4).



**Figura 15:** SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 65 kDa variando-se o fator concentração de proteína. F= controle fibrinogênio indicando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; P= controle metalo protease. Os poços c1-c7 indicam as diferentes concentrações utilizadas de proteína. Observa-se que em todas as amostras houve atividade sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. A hidrólise total da cadeia  $\beta$  não ocorreu apenas no poço c1. Houve atividade sobre a cadeia  $\gamma$  nas amostras c2-c7, sendo mais intensa com o aumento da concentração da enzima.



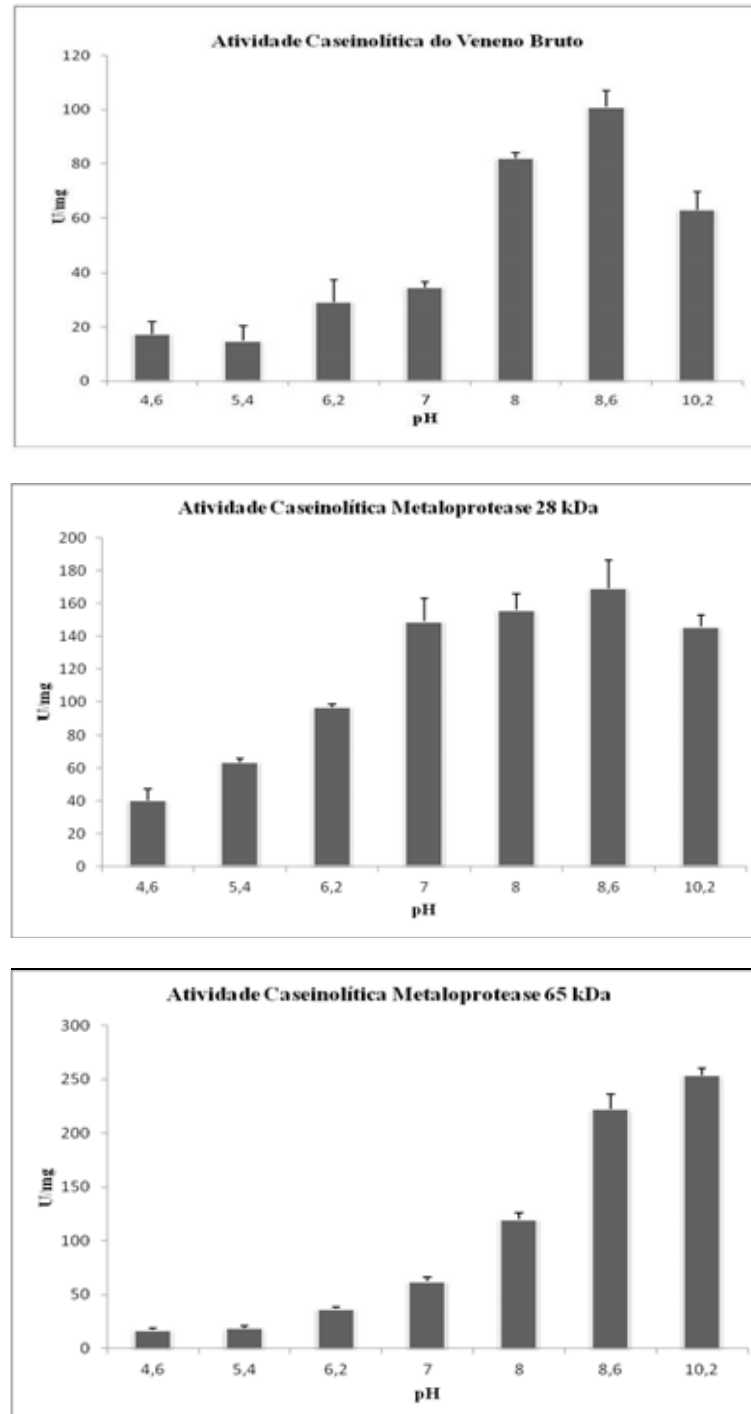
**Figura 16:** SDS-PAGE com coloração Coomassie Blue da atividade fibrinogenolítica da metalo protease de 65 kDa variando-se o fator tempo de incubação. F= controle fibrinogênio indicando as cadeias  $\alpha$ ,  $\beta$  e  $\gamma$ ; P= controle metalo protease. Os poços t1-t6 indicam os diferentes tempos de incubação testados. Observa-se que em todas as amostras houve atividade sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. Em todas as amostras ocorreu atividade sobre a cadeia  $\beta$ , sendo que esta foi totalmente hidrolisada nos poços t4-t6. A atividade mais intensa sobre a cadeia  $\gamma$  ocorreu no tempo de 15 minutos (t1).

#### **4.6. Atividade proteolítica sobre a Caseína**

Os testes da atividade proteolítica sobre a caseína foram realizados com o veneno bruto e com as proteinases purificadas. Com relação à atividade do veneno bruto, observou-se que a partir do pH 6,2 ocorreu um aumento constante da atividade, decaindo apenas no pH 10,2 e que o maior valor, 110 U/mg (unidades caseinolíticas por miligrama de veneno), ocorreu em pH 8,6.

Para a metalo protease de 28 kDa, a atividade caseinolítica apresentou o maior valor, 170 U/mg, em pH 8,6. Já a metalo protease de 65 kDa apresentou atividade crescente com o aumento do pH, com o maior valor (250 U/mg) em pH 10,2. A Figura 17 apresenta os gráficos referentes à atividade caseinolítica do veneno bruto e metalo proteinases de 28 e 65 kDa respectivamente.

A serino protease purificada no presente estudo não apresentou atividade proteolítica sobre a caseína.



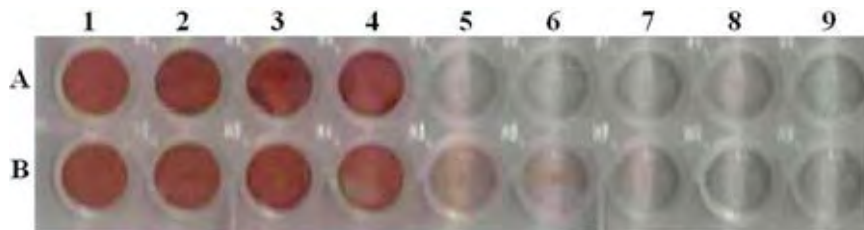
**Figura 17:** Atividade proteolítica do veneno bruto e metalo proteinases de 28 e 65 kDa sobre a caseína. Em cada um dos gráficos, o eixo x indica os diferentes valores de pH testados e o eixo y indica os valores correspondentes em U/mg (unidades caseinolíticas por miligrama de veneno/enzima testados). As barras indicam a média dos valores obtidos com o respectivo desvio padrão.



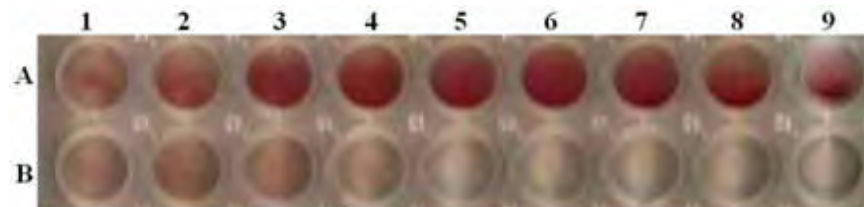
#### 4.7. Ensaio antimicrobiano do veneno bruto – Mínima Concentração Inibitória (MIC)

Após a realização do teste, pode-se observar que o veneno bruto de *Bothrops leucurus* inibiu completamente o crescimento do *Staphylococcus aureus* na concentração de 32  $\mu\text{g/ml}$ , indicando que esse microrganismo é susceptível à ação do veneno. A Figura 18 apresenta os poços contendo as amostras de veneno e cloranfenicol testados. O poço A5 indica exatamente onde ocorreu a inibição microbiana, sendo que nas concentrações anteriores (A1-A4) o crescimento desse microrganismo ainda foi possível, o que pode ser comprovado pela coloração avermelhada que indica a presença de metabolismo microbiano. Para o cloranfenicol, a mínima concentração inibitória contra *S. aureus* foi de 20  $\mu\text{g/ml}$  (amostra B7).

Entretanto, o veneno bruto não inibiu o crescimento da *Escherichia coli* em nenhuma das concentrações utilizadas, o que pode ser observado na Figura 19, nos poços A1-A9 que apresentam a coloração avermelhada indicativa de metabolismo microbiano. O cloranfenicol, apresentado como controle positivo, inibiu o crescimento da *E. coli* na concentração de 5  $\mu\text{g/ml}$  (amostra B5).



**Figura 18:** Teste da mínima concentração inibitória do veneno bruto de *Bothrops leucurus* em *Staphylococcus aureus*. A linha A indica as concentrações finais de veneno (2-512  $\mu\text{g/ml}$ ). A linha B representa o controle positivo utilizando-se o cloranfenicol (0,312-80  $\mu\text{g/ml}$ ).



**Figura 19:** Teste da mínima concentração inibitória do veneno bruto de *Bothrops leucurus* em *Escherichia coli*. A linha A indica as concentrações finais de veneno (2-512  $\mu\text{g/ml}$ ). A linha B representa o controle positivo utilizando-se o cloranfenicol (0,312-80  $\mu\text{g/ml}$ ).

## 5. DISCUSSÃO

Na América do Sul, as serpentes do gênero *Bothrops* têm sido estudadas devido à sua predominância e importância médica em países como o Brasil, Colômbia, Equador, Venezuela, Bolívia e Peru. O veneno produzido pelas serpentes desse gênero caracteriza-se por ser uma mistura complexa de proteínas ativas (aproximadamente 90 % do peso seco) com diferentes propriedades tóxicas. Um acidente botrópico pode ser clinicamente classificado de acordo com a presença de manifestações locais ou sistêmicas. Dentre as manifestações sistêmicas estão as desordens na coagulação, hemorragia, alteração na função plaquetária e depleção do fibrinogênio (HATI et al., 1999). Esses efeitos podem ser causados por miotoxinas, disintegrinas, peptídeos vasoativos e enzimas, como as metalo proteinases, fosfolipases, hialuronidases e serino proteinases (WEISEL, 2005).

Essas enzimas e demais compostos do veneno de serpentes são responsáveis por promover alterações no sistema hemostático. A hemostasia é resultante do equilíbrio entre proteínas pró-coagulantes e anticoagulantes, na qual estão envolvidos os vasos, as plaquetas, as proteínas da coagulação e da fibrinólise e os anticoagulantes naturais. Todos estes componentes estão inter-relacionados, constituindo os sistemas da coagulação, da anticoagulação e da fibrinólise (JOBÉ, 1992).

O fibrinogênio é uma molécula dimérica ligada por pontes dissulfeto com 340.000 Da, sendo que cada um de seus monômeros é composto por três subunidades proteicas não idênticas, as cadeias A $\alpha$ , B $\beta$  e  $\gamma$  com 66.500, 52.000 e 46.500 Da respectivamente, sendo um dos responsáveis pela agregação plaquetária e equilíbrio do sistema hemostático. A trombina catalisa a clivagem dos fibrinopeptídeos (Fp) A e B, convertendo o fibrinogênio em fibrina, que espontaneamente se polimeriza em uma dupla fita de protofibrilas que se transformam em fibras de fibrina, constituindo o coágulo (WEISEL, 2005; DOOLITTLE, 2008). Os coágulos de fibrina são dissolvidos por uma série de outras reações enzimáticas que constituem o sistema fibrinolítico. Estas reações são altamente específicas na clivagem do coágulo de fibrina insolúvel, em vez de fibrinogênio circulante, sendo que existe um equilíbrio dinâmico entre a coagulação e fibrinólise, de modo que a conversão do fibrinogênio em fibrina e a dissolução do coágulo devem ser cuidadosamente reguladas (WEISEL, 2005).

Algumas enzimas presentes nos venenos de serpentes são conhecidas como “thrombin-like enzymes” ou “enzimas semelhantes à trombina” (SVTLEs) por apresentarem atividade

sobre o fibrinogênio e, conseqüentemente sobre a coagulação sanguínea (PIRKLE et al., 1998; MAGALHÃES et al., 2003), sendo que a principal delas é a serino protease. As desordens na coagulação causadas por essas enzimas podem ocorrer em vários níveis da cascata de coagulação do sangue, mas elas agem principalmente sobre o fibrinogênio, clivando as cadeias A $\alpha$  e/ou B $\beta$  e suas ações in vivo levam a uma rápida desfibrinogenação (SERRANO, MAROUN, 2005; SWENSON, MARKLAND, 2005; PHILLIPS et al., 2009).

Dentre as características bioquímicas das SVSPs, destaca-se a glicosilação, a presença de carboidratos ligados às moléculas que variam grandemente entre essas enzimas (MATSUI et al., 2000; MACKESSY, 2010). Como exemplo, a glicosilação de serino proteinases do veneno de *Bothrops jararaca*, em que aproximadamente 62% da sua massa molecular elevada (67 kDa) deve-se ao conteúdo de carboidratos (MURAYAMA et al., 2003). Comportamento semelhante foi observado nos venenos de *B. jararacussu* (SANT'ANA et al., 2008), *B. andianus* (VALERIANO-ZAPANA et al., 2012) e *B. pirajai* (MENALDO et al., 2012). A importância desses carboidratos na estrutura e função dessas enzimas não está completamente elucidada. Em muitos casos, foi demonstrado que as N-glicosilações próximas aos sítios catalíticos interferem na atividade enzimática (ZHU et al., 2005; SOARES, OLIVEIRA, 2009). Outros estudos indicam que os carboidratos são mais importantes para a estabilização dessas enzimas do que para a sua atividade catalítica (KOMORI, NIKAI, 1998). A estabilidade das mesmas frente às variações de temperatura e pH também se devem à presença de pontes dissulfeto (MACKESSY, 2010).

Com base nessas propriedades das serino proteinases, Magalhães e colaboradores (2007) realizaram a purificação e a caracterização enzimática de uma SVTLE presente no veneno de *Bothrops leucurus*. De acordo com esse estudo, essa enzima, denominada leucurobina (leuc) apresentou atividade fibrinogenolítica relevante sobre a cadeia  $\alpha$  e atividade muito baixa sobre a cadeia  $\beta$  do fibrinogênio. Além da atividade sobre o fibrinogênio, foram realizadas algumas deglicosilações da enzima purificada para verificar qual a massa molecular da enzima nativa e qual a massa da enzima contendo as glicosilações. A fração purificada continha tanto leucurobina nativa quanto a glicosilada, sendo que ambas apresentaram massas moleculares muito próximas: enzima nativa com 30 kDa e a enzima glicosilada com 35 kDa. Para a purificação também foram realizadas as mesmas etapas cromatográficas do presente estudo.

Com isso, pode-se verificar que os dados a respeito da serino protease purificada no presente estudo corroboram com o estudo realizado por Magalhães et al. (2007). No presente estudo a enzima em questão também apresentou atividade fibrinogenolítica significativa sobre

a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio e atividade baixa sobre a cadeia  $\beta$  (Figuras 11 e 12). Quanto ao aparecimento das duas bandas próximas no gel (35 e 38 kDa) mesmo após as diversas etapas cromatográficas (Figura 8), pode-se concluir que são a mesma proteína, porém com diferentes taxas de glicosilação. Diferentes níveis de glicosilação são responsáveis pela microheterogeneidade das serino proteinases, sendo também encontrada nas TLEs de venenos de outras serpentes (MAGALHÃES et al., 2007).

SVMPs causam hemorragia por degradar as proteínas da membrana celular endotelial (integrinas e caderinas) e os componentes da membrana basal (fibronectina, laminina, nidogênio e colágeno tipo IV) (BARAMOVA et al., 1989). As proteínas da coagulação (fibrinogênio, fator X, protrombina) também são alvos das atividades proteolíticas dessas enzimas. As metalo proteinases presentes nesses venenos também hidrolisam o fibrinogênio *in vitro* (MUKHERJEE, 2008; WELDON, MACKESSY, 2010) e coagulam a fibrina (MACKESSY, 1993, 1996). Muitas metalo proteinases podem ser consideradas menos específicas em relação ao fibrinogênio, pois na digestão das cadeias existem fatores que podem afetar esse processo, como por exemplo, o tempo de incubação o que resulta na produção de numerosos fragmentos de degradação (MACKESSY, 1993).

A atividade hemorrágica foi atribuída a todas as classes de metalo proteinases, sendo que, em termos de potencial hemorrágico e diversidade de atividades biológicas, as SVMPs P-III (50-80 kDa) são as mais eficazes e diversas dentre as três classes, pois são capazes de inibir a agregação plaquetária (LAING, MOURA-DA-SILVA, 2005). As metalo proteinases P-III são capazes de induzir, não somente o sangramento local, como também o sistêmico, enquanto que o tipo P-I induz apenas a hemorragia local. A atividade proteolítica desse grupo de enzimas P-III não é correspondente à sua atividade hemorrágica, sugerindo a existência de domínios adicionais não catalíticos que agem provavelmente através do substrato alvo (GUTIÉRREZ et al., 2005). Com base nas características proteolíticas das SVMPs diversos trabalhos de purificação e caracterização foram realizados.

De acordo com a literatura, foi realizada a purificação e a caracterização enzimática de uma metalo protease da classe P-I com 23 kDa presente no veneno de *Bothrops leucurus*. Essa enzima, denominada leucurolisina-a (leuc-a), que constitui apenas 5,4 % do veneno bruto total, foi purificada por duas etapas cromatográficas, exclusão molecular e troca iônica. Apresentou atividade proteolítica sobre a caseína e atividade fibrinogenolítica, clivando a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio (BELLO et al., 2006; GREMSKI, et al., 2007). Outra metalo protease de massa molecular próxima, 23,1 kDa, também foi purificada e caracterizada apresentando as mesmas atividades proteolíticas sobre a caseína e o fibrinogênio.

Denominada BleucMT, constitui apenas 1,75 % do total do veneno bruto (GOMES et al., 2011)

Uma metalo protease de 55 kDa foi purificada e caracterizada, apresentando atividade proteolítica sobre a caseína e atividade fibrinogenolítica intensa sobre a cadeia  $\alpha$  do fibrinogênio. Foram realizados testes que variavam a concentração da enzima e o tempo de incubação, não ocorrendo atividade sobre as cadeias  $\beta$  e  $\gamma$ . Essa enzima, após ser purificada, apresentou massa molecular de 65 kDa devido à presença de carboidratos ligados à proteína nativa, sendo então submetida a um tratamento para a retirada das glicosilações. A proteína nativa apresentou massa molecular de 55 kDa, pertencente à classe P-III, sendo denominada leucurolisina-b (leuc-b) e constituindo cerca de 1,2 % do veneno bruto total (SANCHEZ et al., 2007).

Com isso, pode-se observar que no presente estudo as atividades proteolíticas sobre a caseína e o fibrinogênio das metalo proteinases purificadas foram coniventes com os resultados presentes na literatura, ou seja, as enzimas de 28 kDa (classe P-I) e 65 kDa (classe P-III) podem ser classificadas como metalo proteinases por apresentarem as atividades proteolíticas. Porém, não existem trabalhos referentes às SVMPs de *Bothrops leucurus* com as massas moleculares encontradas no presente estudo, indicando a purificação de novas enzimas ainda não descritas ou que as enzimas do presente estudo sejam as mesmas encontradas nos trabalhos anteriores, porém com diferentes níveis de glicosilação. Interessante ressaltar que a metalo protease de 65 kDa purificada apresentou elevada atividade proteolítica sobre a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio (Figuras 15 e 16), o que não foi observado anteriormente para as metalo proteinases já conhecidas de *B. leucurus*. De acordo com Mackessy (1996), algumas metalo proteinases são capazes de catalisar a hidrólise da cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio.

A atividade caseinolítica observada no veneno bruto (Figura 17) deve-se à ação proteolítica das metalo proteinases presentes no mesmo. Este teste é geralmente utilizado para verificar em quais condições de pH, temperatura e tempo de incubação as proteinases apresentam melhor atividade proteolítica, além de ser útil na identificação de frações não purificadas que apresentam essas enzimas (SANCHEZ et al., 2007; GOMES et al., 2011). No veneno bruto e na metalo protease de 28 kDa, o pH que apresentou o maior valor de hidrólise da caseína foi 8,6,. Porém a metalo protease de 65 kDa teve a maior atividade em pH 10,2.

Algumas enzimas fibrino(geno)líticas causam rápida desfibrinogenação quando são administradas intravenosamente, reduzindo a viscosidade do sangue como um todo (CHANG, HUANG, 1995) e aumentando o fluxo sanguíneo (ESCHENFELDER, 1996). Algumas dessas

proteínases de venenos de serpentes têm sido utilizadas como agentes desfibrinantes em uma série de condições clínicas incluindo trombose venosa profunda, infarto do miocárdio, embolia pulmonar, doença vascular periférica, angina, adesivos cirúrgicos e quadros de rejeição de transplantes renais (STOCKER, 1990; THOMAZINI-SANTOS et al., 2001). Por isso, essas enzimas são de grande interesse para a clínica médica, principalmente as que apresentam elevado grau de pureza e que não desenvolvem outros efeitos farmacológicos.

As fosfolipases presentes nos venenos de serpentes possuem diferentes isoformas e apresentam uma massa molecular que varia de 13 a 18 kDa (WARD et al., 2001). Além disso, elas podem ser classificadas em dois grupos diferentes de acordo com o seu ponto isoelétrico: as fosfolipases ácidas que são menos tóxicas e as básicas, que são usualmente responsáveis pela maioria dos efeitos tóxicos dos venenos de serpentes (VARGAS et al., 2012). Higuchi e colaboradores (2007) purificaram duas isoformas de PLA2 presentes no veneno de *Bothrops leucurus* a partir de três processos cromatográficos: exclusão molecular, troca iônica e cromatografia de fase reversa. Em um estudo mais recente, foi purificada e caracterizada uma fosfolipase com massa molecular de aproximadamente 15 kDa (NUNES et al., 2011). As PLA2 são de grande interesse científico devido à sua abundância no veneno e às suas diversas funções adquiridas durante sua evolução (BONFIM et al., 2008), como os efeitos antimicrobianos, antitumorais, parasiticidas e efeitos pró ou anti inflamatórios (RUCAVADO et al., 2002; STABELI et al., 2007; SAMI et al., 2008; OLIVEIRA et al., 2009). No presente trabalho, duas isoformas dessa proteína foram separadas, apresentando massas moleculares de 14 e 15 kDa, respectivamente.

A L-aminoácido oxidase confere a coloração amarelada de alguns venenos de serpentes devido à presença do cofator flavina (principalmente FAD) (SANCHEZ, MAGALHÃES, 2001). Apesar de alguns componentes do veneno apresentar um grande potencial no sistema homeostático, como as metalo proteinases e serino proteinases, o papel da LAO na agregação plaquetária e coagulação ainda permanece controverso. Enquanto algumas LAOs induzem a agregação plaquetária (ALI et al., 2000; IZIDORO et al., 2006), outras promovem a inibição desse processo de acordo com a concentração dessa enzima (SAMEL et al., 2006, 2008). Naumann e colaboradores (2011) estudaram os efeitos da LAO de *B. leucurus* em alguns componentes do sistema homeostático, concluindo que essa enzima não induz a agregação plaquetária, inibindo a mesma no plasma sanguíneo. Posteriormente serão realizados testes de coagulação com a enzima purificada no presente estudo para verificar se esta induz ou inibe a agregação plaquetária.

Em dois estudos de purificação e caracterização enzimática da L-aminoácido oxidase presente no veneno de *B. leucurus*, foram encontradas enzimas com diferentes massas moleculares, 60 (NAUMANN et al., 2011) e 80 kDa (TORRES et al., 2010). A enzima nativa com 60 kDa apresentou uma isoforma glicosilada com aproximadamente 64 kDa. No presente estudo, a purificação resultou em uma enzima de coloração amarelada com massa molecular de 66 kDa, indicando ser outra isoforma. A presença de isoformas dessa enzima em um mesmo veneno pode ser explicada por três fatores distintos: diferenças existentes na própria enzima, diferentes níveis de glicosilação (SAKURAI et al., 2001; STABELI et al., 2004) ou síntese a partir de diferentes genes (STILES et al., 1991).

Sabe-se que os venenos de serpentes apresentam atividade antimicrobiana contra vírus, fungos, protozoários e bactérias. Com base nessa propriedade, foi realizado o teste da mínima concentração inibitória (MIC) do veneno bruto de *B. leucurus* sobre duas linhagens de patógenos humanos: a *E. coli*, uma bactéria Gram-negativa e o *S. aureus*, uma Gram-positiva. Na literatura existem apenas dois trabalhos que apresentam testes antimicrobianos que utilizam o veneno em questão. Torres e colaboradores (2010) realizaram testes antimicrobianos contra *S. aureus*, *E. coli* e outros microrganismos utilizando o veneno bruto de *B. leucurus* e uma LAAO purificada com massa molecular de 80 kDa. O veneno bruto apresentou atividade inibitória contra o *S. aureus* na concentração de 25 µg/ml no teste MIC, entretanto, não inibiu o crescimento de *E. coli*. A LAAO não inibiu o crescimento de nenhum dos microrganismos. No presente estudo, o veneno bruto inibiu o crescimento do *S. aureus* na concentração de 32 µg/ml, sendo muito próxima à concentração encontrada na literatura. Outro estudo mais recente utilizou uma lectina de 30 kDa purificada do veneno de *B. leucurus* em testes de inibição do crescimento de Gram-positivas e negativas, dentre elas o *S. aureus* e a *E. coli*, apresentando atividade antimicrobiana contra o *S. aureus*, porém não inibindo o crescimento da *E. coli* (NUNES, et al., 2011).

Alguns estudos que utilizaram fosfolipases de venenos de serpentes em testes de inibição do crescimento microbiano demonstraram que essas enzimas também apresentam atividade antimicrobiana contra patógenos Gram-positivos, dentre eles, o *S. aureus*, porém, não inibindo bactérias Gram-negativas. As PLA2 agem degradando os fosfolipídeos que constituem as membranas celulares desses microrganismos (KODURI et al., 2002; NEVALAINEN et al., 2008; VARGAS et al., 2012). Essas enzimas são capazes de penetrar no peptidoglicano das Gram-positivas e, dessa forma, ter acesso aos fosfolipídeos que compõem a membrana celular, entretanto, elas são capazes de hidrolisar esses mesmos componentes das Gram-negativas apenas se a parede rica em lipopolisacarídeos for

previamente rompida. Essa é a razão pelas quais muitos venenos não apresentam atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas, a dificuldade em atingir a membrana celular (NEVALAINEN et al., 2008). Além disso, já foi verificado na literatura PLA2 com atividade antimicrobiana contra patógenos Gram-negativos. Sami e colaboradores (2008) estudaram uma fosfolipase presente no veneno de *Agkistrodon halis* que é capaz de promover modificações morfológicas que alteram a integridade das membranas celulares de Gram-positivas e negativas, diferenciando-se das outras PLA2 que devem necessariamente atravessar as paredes celulares para ter acesso aos fosfolipídeos. Em outros estudos, o peptídeo C-terminal de algumas PLA2 e da miotoxina II do veneno de *B. asper* foi o responsável pela atividade antimicrobiana em bactérias Gram-positivas e negativas (SANTAMARIA et al., 2005; ARAGÃO et al., 2008). Esses dados mostram as diferentes formas de ação dos compostos dos venenos de serpentes na inibição do crescimento de diversos microrganismos e a importância em se compreendê-los para a sua possível utilização na produção de fármacos e antibióticos.

## 6. CONCLUSÕES

- A presença de atividade proteolítica sobre a caseína nas enzimas purificadas com 28 e 65 kDa indicam que as mesmas são metalo proteinases. A atividade presente no veneno bruto deve-se a essa classe de enzimas, pois as serino proteinases testadas não hidrolisaram a caseína;
- As metalo proteinases purificadas a partir do veneno bruto de *Bothrops leucurus* não foram encontradas na literatura;
- A metalo protease de 65 kDa apresentou elevada atividade fibrinogenolítica sobre a cadeia  $\gamma$  do fibrinogênio, característica não encontrada nas metalo proteinases descritas presentes no veneno de *B. leucurus*;
- A serino protease purificada apresentou duas bandas com massas moleculares muito próximas que não puderam ser separadas, indicando que podem ser isoformas da mesma proteína que se diferem pelo número de glicosilações. Essa enzima apresentou



atividade proteolítica sobre o fibrinogênio, indicando seu papel no sistema homeostático;

- Uma L-aminoácido oxidase com 66 kDa foi purificada, sendo que na literatura são descritas enzimas com massas moleculares diferentes, o que indica que essa enzima também pode ser uma isoforma com um nível diferente de glicosilação;
- No estudo verificaram-se as propriedades proteolíticas presentes no veneno de *B. leucurus* e algumas frações que são responsáveis por essa atividade. Além disso, observou-se que realmente existem variações dentro do veneno de uma mesma espécie de serpente, o que foi comprovado pelas diferenças nas massas moleculares e atividade proteolítica das frações purificadas, provavelmente ocasionadas pelos diferentes níveis de glicosilação existentes nessas enzimas;
- O veneno bruto de *Bothrops leucurus* apresenta atividade antimicrobiana para o *S. aureus*, um patógeno gram-positivo, entretanto, não foi capaz de inibir o crescimento de um microrganismo gram-negativo (*E. coli*). De acordo com esse resultado, e do que existe na literatura, é interessante explorar mais a fundo o potencial antimicrobiano do veneno bruto de *B. leucurus*, bem como, das frações purificadas, realizando novos testes com tipos diferentes de microrganismos.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y. et al. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potently inhibited by GL in vitro. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 21(9), p. 924–927, 1998.

ABREU, V. A. et al. 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.**, v. 148(1), p. 142-149, 2007.

ALI, S. A. et al. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 384, p. 216-226, 2000.

ALVES, R. M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 151, p. 542-550, 2008.

ANDE, S. R. et al. Mechanism of cell death induction by L-amino acid oxidase, a major component of ophidian venom. **Apoptosis**, v. 11, p. 1439-1451, 2006.

ANDREWS, J. M. Determination of minimum inhibitory concentrations. **J. Antimicrob. Chemoth.**, v. 48, p. 5-16, 2001.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H. et al. Structural and functional characterization of an acidic platelet aggregation inhibitor and hypotensive phospholipase A(2) from *Bothrops jararacussu* snake venom. **Biochem. Pharmacol.**, v. 64(4), p. 723-732, 2002.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54(7), p. 949-957, 2009.

ARAGÃO, E. A.; CHIOATO, L.; WARD, R. J. Permeabilization of *E. coli* K12 inner and outer membranes by bothropstoxin-I, a LYS49 phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 15, p. 538-546, 2008.

ARAÚJO, F. A. A.; SANTALÚCIA, M.; CABRAL, R. F. Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. In: CARDOSO, J. L. C. et al, orgs. **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier, p. 6-12, 2003.

ARIMA, J. et al. Structural characterization of L-glutamate oxidase from *Streptomyces* sp. X-119-6. **FEBS J.**, v. 276, p. 3894-3903, 2009.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2: a structural review. **Toxicon**, v. 34, p. 827-841, 1996.

BAILEY, P.; WILCE, J. Venom as a source of useful biologically active molecules. **Emerg. Med.**, v. 13(1), p. 28-36, 2001.

BARLOW, A. et al. Coevolution of diet and prey-specific venom activity supports the role of selection in snake venom evolution. **Proc. R. Soc.**, v. 276, 2009.

BARBOSA, P. S. et al. Renal and antibacterial effects induced by myotoxin I and II isolated from *Bothrops jararacussu* venom. **Toxicon**, v. 46(4), p. 376-386, 2005.

BARRETT, R.; MADERSON, P. F. A.; MESZLER, R. M. The pit organs of snakes. In: PARSONS, T. S. ed. **Biology of Reptilia**. Academic Press, p. 277-300, 1970.

BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **J. Toxicol. Environ. Health B**, v. 12, p. 553-571, 2009.

BELLO, C. A. et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, p. 189-200, 2006.

BENITEZ, E. et al. Enzyme and earthworm activities during vermicomposting of carbaryl-treated sewage sludge. **J. Environ. Qual.**, v. 28, p. 1099-1104, 1999.

BÉRNILS, R. S.; COSTA, C. Brazilian reptiles – List of species (2011). Disponível em <http://www.sbherpetologia.org.br>. **Sociedade de herpetologia**. Acessado em 10 de Setembro de 2012.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms, **Pharmacol. Ther.**, v. 62, p. 325–372, 1994.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Snake venom metalloendopeptidases: reprotlysins, **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 345-368, 1995.

BLOW, D. M. The tortuous story of Asp... His... Ser: Structural analysis of alpha chymotrypsin. **Trends Biochem. Sci.**, v. 22, p. 405-408, 1997.

BONFIM, V. L. et al. Toxicity of phospholipases A2 D49 (6–1 and 6–2) and K49 (Bj-VII) from *Bothrops jararacussu* venom, **Cell Biol. Toxicol.**, v. 25, p. 523-532, 2008.

BRAGA, M. D. et al. Purification and biological effects of L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51(2), p. 199-207, 2008.

BRAUD, S.; BON, C.; WISNER, A. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, p. 851-859, 2000.

CALGAROTTO, A. K. et al. Biological and biochemical characterization of new basic phospholipase A2 BmTX-I isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 51, p. 1509-1519, 2008.

CHANG, M. C.; HUANG, T. F. Characterization of a thrombin-like enzyme, gramin, from the venom of *Trimeresurus gramineus* and its *in vivo* antithrombotic effect. **Toxicon**, v. 33, p. 1087-1098, 1995.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29(2), p. 1279-1303, 1991.

CHU, N. S. Contribution of a snake venom toxin to myasthenia gravis: the discovery of alpha-bungarotoxin in Taiwan. **J. Hist. Neurosci.**, v. 14, p. 138-48, 2005.

CHWETZOFF, S. et al. Nigexine, a phospholipase A2 from cobra venom with cytotoxic properties not related to esterase activity. **J. Biol. Chem.**, v. 22, p. 13289-13297, 1989.

CISCOTTO, P. et al. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 55, p. 330-341, 2009.

CLSI. **Performance Standards for Antimicrobial Susceptibility Testing**; Twenty-Second Informational Supplement., v. 32, n. 3, p. 1-188, 2012.

COSTA TORRES, A. F. et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: phospholipase A2 and L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795-804, 2010.

CUSHMAN, D. W. et al. Development of specific inhibitors of angiotensin I converting enzyme (kininase II). **Fed. Proc.**, v. 38, p. 2778-82, 1979.

DASCOMBE, W. H. et al. Application of thrombin based fibrin glue and non thrombin based batroxobin glue on intact human blood vessels: evidence for transmural thrombin activity. **Thromb. Haemost.**, v. 78, p. 947-951, 1997.

DENNIS, E. A. et al. Phospholipase A2 enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition and therapeutic intervention. **Chem. Rev.**, v. 111, p. 6130-6185, 2011.

DEWYS, W. D.; KWAAN, H. C.; BATHINA, S. Effect of defibrination on tumor growth and response to chemotherapy. **Cancer Res.**, v. 36, p. 3584-3587, 1976.

DOOLITTLE, R. F. Searching for differences between fibrinogen and fibrin that affect the initiation of fibrinolysis. **Cardiovasc. Hematol. Agents Med. Chem.**, v. 6(3), p. 181-189, 2008.

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, v. 40, p. 659-665, 2002.

EDGAR, W.; PRENTICE, C. R. M. The proteolytic action of ancrod on human fibrinogen and its polypeptide chains. **Thromb. Res.**, v. 2, p. 85-95, 1973.

EGGERTSEN, G.; LIND, P.; SJOQUIST, J. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the Indian cobra (*Naja naja siamensis*). **Mol. Immunol.**, v. 18, p. 125-133, 1981.

EHARA, T. et al. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase. **FEBS Lett.**, v. 531, p. 509-512, 2002.

ESCALANTE, T. et al. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **J. Proteomics**, v. 74, p. 1781-1794, 2011.

ESCHENFELDER, V. Ancrod as an antithrombotic and thrombolytic agent. In: ZAVOICO G. ed. **Advances in anticoagulant and antithrombotic and thrombolytic therapeutics**. Southbrough: IBC Biomedical Library Series, 1996.

FAUST, A. et al. The Structure of a bacterial L-amino acid oxidase from *Rhodococcus opacus* gives new evidence for the hydride mechanism for dehydrogenation. **J. Mol. Biol.**, v. 367, p. 234-248, 2007.

FENARD, D. et al. Secreted phospholipases A(2), a new class of HIV inhibitors that block virus entry into host cells. **J. Clin. Invest.**, v. 104, p. 611-618, 1999.

FERREIRA, R. N. et al. Complete amino-acid sequence, crystallization and preliminary X-ray diffraction studies of leucurolysin-a, a nonhaemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Acta Crystallogr. Sect. F Struct. Biol. Cryst. Commun.**, v. 65, p. 798-801, 2009.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases, **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Exploring snake venom proteomes: multifaceted analyses for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v. 8, p. 909-920, 2008a.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity, **FEBS J.**, v. 275, p. 3016-3030, 2008b.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **J. Proteomics**, v. 72, p. 200-209, 2009.

FRANÇA, S. C. et al. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 355, p. 302-306, 2007.

GABRIEL, L. M. et al. Tumor cytotoxicity of leucurolysin-B, a P-III snake venom metalloproteinase from *Bothrops leucurus*. **J. Venomous Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 18, p. 24-33, 2012.

GEORGIEVA, D.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. **Expert Rev. Proteomics**, v. 5, p. 787-797, 2008.

GEORGIEVA, D. et al. The structure of a native L-amino acid oxidase, the major component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions. **Mol. Bio Syst.**, v. 7, p. 379-384, 2011.

GOMES, M. S. R. et al. Purification and functional characterization of a new metalloproteinase (BleucMP) from *Bothrops leucurus* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 153(C), p. 290-300, 2011.

GRACHEVA, E. O. et al. Molecular basis of infrared detection by snakes. **Nature**, v. 464(7291), p. 1006-1011, 2010.

GREMSKI, L. H. et al. Cytotoxic, thrombolytic and edematogenic activities of leucurolysin-a, a metalloproteinase from *Bothrops leucurus* snake venom. **Toxicon**, v. 50, p. 120-134, 2007.

GUARNIERI M.C.; SOUTO, A. S.; DUARTE, M. T. L. First record of *Bothrops leucurus* (Snakes: Viperidae) in the state of Pernambuco, Northeastern Brazil. **Anais da Reunião Científica Anual do Instituto Butantan**, p. 129-129, 2000.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, v. 45, p. 997-1011, 2005.

GUTIÉRREZ, J. M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T. Snake venom metalloproteinases. Biological roles and participation in the pathology of envenomation In: MACKESSY, S.P. ed. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 115-138, 2009.

HARRIS, J. B. Phospholipases in snake venoms and their effects on nerve and muscle. In: HARVEY, A.L. ed. **Snake Toxins**. Pergamon Press, New York, p. 91-129, 1991.

HARTMAN, G. D. et al. Non-peptide fibrinogen receptor antagonists. 1. Discovery and design of exosite inhibitors. **J. Med. Chem.**, v. 35, p. 4640-4642, 1992.

HATI, R. et al. Snake venom hemorrhagins. **Crit. Rev. Toxicol.**, v. 29, p. 1-19, 1999.

HIGUCHI, D. A. et al. Purification and partial characterization of two phospholipases A2 from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 89, p. 319-328, 2007.

HITE, L. A. et al. Sequences for four snake venom metalloproteinases: Structure, classification, and their relationship to mammalian reproductive proteins. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 308(1), p. 182-191, 1994.

IZIDORO, L. F. M. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 7034-7043, 2006.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venom In: BORN, G. V. R. et al. eds. **Handbook of Experimental Pharmacology**, v. 52, Springer-Verlag, New York, p. 61-158, 1979.

JACKSON, K. The evolution of venom-delivery systems in snakes. **Zool. J. Linn. Soc.**, v. 137, p. 337-354, 2003.

JOBE, M. I. Mechanisms of coagulation and fibrinolysis In: LOTS-PEICH-STEININGER, C. A. et al. eds. **Clinical hematology: principles procedures correlations**. London: J. B. Lippincott, p. 579-98, 1992.

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L. et al. *Lachesis muta* (Viperidae) cDNAs reveal diverging pit viper molecules and scaffolds typical of cobra (Elapidae) venoms: implications for snake toxin repertoire evolution. **Genetics**, v. 173, p. 877-89, 2006.

KANG, T.S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS J.**, v. 278(23), p. 4544-4576, 2011.

KARDONG, K. V. Colubrid snakes and Duvernoy's "venom" glands. **J. Toxicol. Toxin. Reviews**, v. 21, p. 1-19, 2002.

KASAI, K. et al. Novel L-amino acid oxidase with antibacterial activity against methicillin-resistant *Staphylococcus aureus* isolated from epidermal mucus of the flounder *Platichthys stellatus*. **FEBS J.**, v. 277, p. 453-465, 2010.

KINI, R. M. **Venom phospholipase A2 enzymes: structure, function and mechanism.** Chichester, UK: John Wiley & Sons, p. 1-511, 1997.

KINI, R. M. Molecular molds with multiple missions: functional sites in three-finger toxins. **Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.**, v. 29, p. 815-822, 2002.

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

KINI, R. M. Structure-function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms. **Toxicon**, v. 45, p. 1147-1161, 2005.

KINI, R. M.; FOX, J. W. Milestones and future prospects in snake venom research. **Toxicon**, v. 62, p. 1-2, 2013.

KITANI, Y. et al. Identification of an antibacterial protein as L-amino acid oxidase in the skin mucus of rockfish *Sebastes schlegeli*. **FEBS J.**, v. 274, p. 125-136, 2007.

KOH, D. C. I.; ARMUGAN, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, v. 63, p. 3030-3041, 2006.

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

KODURI, R. S. et al. Bactericidal properties of human and murine groups I, II, V, X, and XII secreted phospholipases A2. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 5849-5857, 2002.

KOMORI, Y.; NIKAI, T. Chemistry and biochemistry of kallikrein-like enzyme from snake venoms. **J. Toxicol. Toxin Rev.**, v. 17, p. 261-277, 1998.

KOSTIZA, T.; MEIER, J. Nerve growth factors from snake venoms: chemical properties, mode of action and biological significance. **Toxicon**, v. 34, p. 787-806, 1986.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-685, 1970.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 987-996, 2005.

LEE HO, P. et al. Angiostatinlike molecules are generated by snake venom metalloproteinases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 294, p. 879-885, 2002.

LEWIS, R. L.; GUTMANN, L. Snake venoms and the neuromuscular junction. **Semin. Neurol.**, v. 24, p. 175-179, 2004.

LI, Z. Y. et al. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v. 32, p. 1349-1358, 1994.

LIMA-DUARTE, M. T. et al. *Bothrops leucurus* (white-tailed lancehead) Brazil: Pernambuco. **Herpetological Review**, v. 34(2), p. 168-168, 2003.

LIRA-DA-SILVA, R. M.; LIMA, R. A.; DIAS, E. J. R. *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae): padrão alimentar. **Libro del Resumenes Del IV Congreso Latinoamericano de Herpetologia**, Santiago do Chile, p. 52-52, 1996.

LIRA-DA-SILVA, R. M. **Estudo farmacológico do veneno de *Bothrops leucurus* (Serpentes; Viperidae)**. Tese de Doutorado. Faculdade de Ciências Médicas, Universidade Estadual de Campinas, 203p., 2001.

LIZANO, S.; DOMONT, G.; PERALES, J. Natural phospholipases A2 myotoxins inhibitor proteins from snakes, mammal and plants. **Toxicon**, v. 42(8), p. 963-977, 2003.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. La actividad proteolítica de los venenos de serpientes de Costa Rica sobre la caseína. **Revista de Biología Tropical**, v. 31(1), p. 37-40, 1983.

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

MACHEROUX, P. et al. L-Amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. **Eur. J. Biochem.**, v. 268, p. 1679-1686, 2001.

MACKESSY, S. P. Fibrinogenolytic proteinases from the venoms of juvenile and adult northern Pacific rattlesnake (*Crotalus viridis oreganus*). **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 106, p. 181-189, 1993.

MACKESSY, S. P. Characterization of the major metalloprotease isolated from the venom of *Crotalus viridis oreganus*. **Toxicon**, v. 34, p. 1277-1285, 1996.

MACKESSY, S. P. Thrombin-like enzymes in snake venoms In: KINI, R. M. et al. eds. **Toxins and Hemostasis: From Bench to Bedside**, Springer-Verlag, Heidelberg, p. 519-557, 2010.

MAGALHÃES, A. et al. Coagulant thrombinlike enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 136, p. 255-266, 2003.

MAGALHÃES, A. et al. Purification and properties of a coagulant thrombin-like enzyme from the venom of *Bothrops leucurus*. **Comp. Biochem. Physiol. - Part A: Molecular & Integrative Physiology**, v. 146(4), p. 565-575, 2007.

MARCUSSI, S. et al. Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. **Curr. Top. Med. Chem.**, v. 7, p. 743-756, 2007.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system, **Toxicon**, v. 36, p. 1749 -1800, 1998.



MARKLAND JR, F. S. Snake venom fibrinogenolytic and fibrinolytic enzymes: an updated inventory. Registry of Exogenous Hemostatic Factors of the Scientific and Standardization Committee of the International Society on Thrombosis and Haemostasis. **Thromb. Haemost.**, v. 79, p. 668-674, 1998

MARSH, N.; WILLIAMS, V. Practical applications of snake venom toxins in haemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 1171-1181, 2005.

MARTINS, M.; MARQUES, O. A. V.; SAZIMA, I. Ecological and phylogenetics correlates of feeding habits in neotropical pitvipers of the genus *Bothrops*. In: SCHUETT, G.; HÖGGREN, M.; GREENE, H. W. eds. **Biology of the vipers**. Carmel: Biological Sciences Press, p. 1-22, 2002.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteinases affecting hemostasis and thrombosis. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MEBS, D. Snake venom composition and evolution of Viperidae. **Kapua-Darmstadter-zur Naturgeschichte**, v. 8, p. 145-148, 1999.

MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: CARDOSO, J. L. C. et al. eds. **Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, Clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo, Sarvier, p. 33-61, 2003.

MENALDO, D. L. et al. Biochemical characterization and comparative analysis of two distinct serine proteinases from *Bothrops pirajai* snake venom. **Biochimie**, v. 30, p. 1-14, 2012.

MORAES, C. K.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Effect of rACLF, a recombinant snake venom metalloproteinase on cell viability, chemokine expression and degradation of extracellular matrix proteins. **Toxicon**, v. 48, p. 641-648, 2006.

MORAIS, I. C. O. et al. *Bothrops leucurus* venom induces nephrotoxicity in the isolated perfused kidney and cultured renal tubular epithelia. **Toxicon**, <http://dx.doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.10.005>, 2012.

MORI, S.; BARTH, H. G. **Size Exclusion Chromatography**. Springer-Verlag, Berlin Heidelberg, p. 11-15, 1999.

MOUSTAFA, I. M. et al. Crystal Structure of LAAO from *Calloselasma rhodostoma* with an L-Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism. **J. Mol. Biol.**, v. 364, p. 991-1002, 2006.

MUKHERJEE, A. K. Characterization of a novel pro-coagulant metalloprotease (RVBCMP) possessing  $\alpha$ -fibrinogenase and tissue hemorrhagic activity from the venom of *Daboia russelli russelli* (Russell's viper): evidence of distinct coagulant and haemorrhagic sites in RVBCMP. **Toxicon**, v. 51, p. 923-933, 2008.

MURAKAMI, M.; KUDO, I. Diversity of phospholipases A<sub>2</sub> enzymes. Secretory phospholipases A<sub>2</sub>. **Biol. Pharm. Bull.**, v. 27, p. 1158-1164, 2004.

MURAYAMA, N. et al. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1652, p. 1-6, 2003.

NAGASHIMA, Y. et al. Isolation and cDNA cloning of an antibacterial L-amino acid oxidase from the skin mucus of the great sculpin *Myoxocephalus polyacanthocephalus*. **Comp. Biochem. Physiol. B – Biochem. Mol. Biol.**, v. 154, p. 55-61, 2009.

NAUMANN, G. B. et al. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1810, p. 683-694, 2011.

NEVALAINEN, T. J. et al. Actions of secreted phospholipases A2. **Review. Biochim. Biophys. Acta**, v. 1781, p. 1-9, 2008.

NUNES, D. C. O. et al. Isolation and functional characterization of proinflammatory acidic phospholipase A2 from *Bothrops leucurus* snake venom, **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 154, p. 226-233, 2011.

NUNES, E. S. et al. Inactivation and fragmentation of lectin from *Bothrops leucurus* venom by gamma irradiation. **Rad. Phys. Chem.**, v. 8, p. 484-487, 2012a.

NUNES, E. S. et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, p. 667-671, 2012b.

OLIVEIRA, C. F. et al. Insights of local tissue damage and regeneration induced by BnSP-7, a myotoxin isolated from *Bothrops (neuwiedi) pauloensis* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 560-569, 2009.

OWNBY, C. L. et al. Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411-445, 1999.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Review: snake venom metalloproteinases – structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 142, p. 328-346, 2006.

PAES LEME, A. F. et al. Hemorrhagic Activity of HF3, a Snake Venom Metalloproteinase: Insights from the Proteomic Analysis of Mouse Skin and Blood Plasma. **J. Prot. Res.**, v. 11(1), p. 279-291, 2012.

PAL, S. K. ET al. Snake venom as therapeutic agents: from toxin to drug development. **Indian J. Exp. Biol.**, v. 40(12), p. 1353-1358, 2002.

PATTON, W. F. Detection technologies in proteome analysis. **Journal of Chromatography B**, v. 771, p. 3-31, 2002.

PETRICEVICH, V. L.; MENDONCA, R. Z. Inhibitory potential of *Crotalus durissus terrificus* venom on measles virus growth. **Toxicon**, v. 42, p. 143-53, 2003.

PHILLIPS, D. J.; SWENSON, S. D.; MARKLAND JR, F. S. Thrombin-like snake venom serine proteinases In: MACKESSY, S. P. ed. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. CRC Press/Taylor & Francis Group, Boca Raton, FL, p. 139-154, 2009.

PIRKLE, H. et al. Thrombin-like enzyme from the venom of *Bitis gabonica*. Purification, properties, and coagulant actions. **J. Biol. Chem.**, v. 261, p. 8830-8835, 1998.

PORTO, B. N. et al. Biochemical and biological characterization of the venoms of *Bothriopsis bilineata* and *Bothriopsis taeniata* (Serpentes: Viperidae). **Toxicon**, v. 50(2), p. 270-277, 2007.

POUGH, F. H.; HEISER, J. B.; MCFARLAND, W. N. **A vida dos vertebrados**. 2ª ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 798p, 1999.

PU, X. C.; WONG, P. T.; GOPALAKRISHNAKONE, P. A novel analgesic toxin (hannalgesin) from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Toxicon**, v. 33, p. 1425-1431, 1995.

PUORTO, G. et al. Combining mitochondrial DNA sequences and morphological data to infer species boundaries: Phylogeography of lancehead pitvipers in the Brazilian Atlantic Forest, and the status of *Bothrops pradoi* (Squamata: Serpentes: Viperidae). **J. Evol. Biol.**, v. 14, p. 527-538, 2001.

RODRIGUES, R. S. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009.

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators Inflamm.**, v. 11, p. 121-128, 2002.

SAKURAI, Y. H. et al. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, v. 39, p. 1829-1833, 2001.

SAMEL, M. et al. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1764, p. 707-714, 2006.

SAMEL, M. et al. L-amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom. **Comp. Biochem. Physiol. B**, v. 149, p. 572-580, 2008.

SAMI, R. P. et al. Purification, characterization and bactericidal activities of basic phospholipase A2 from the venom of *Agkistrodon halys* (Chinese pallas). **Biochimie**, v. 90, p. 1-17, 2008.

SANCHEZ, E. F.; MAGALHÃES, A. Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta* venom. **Brazilian J. Med. Biol. Res.**, v. 24, p. 249-260, 1991.

SANCHEZ, E. F. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**, v. 30, p. 95-103, 1992.

SANCHEZ, E. F. et al. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 468, p. 193-204, 2007.

SANTAMARIA, C. et al. Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A2 from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. **Toxicon**, v. 45, p. 807-815, 2005.

SANT'ANA, C. D. et al. BjussuSP-I: a new thrombin-like enzyme isolated from *Bothrops jararacussu* snake venom, **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 151A, p. 443-454, 2008.

SANTOS-FILHO, N. A. et al. A new acidic myotoxic, anti-platelet and prostaglandin I2 inducer phospholipase A2 isolated from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, v. 52, p. 908-917, 2008.

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

SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45(8), p. 969-985, 2005.

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

SILVA, E. F. et al. Biochemical properties of an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* (white-tailed jararaca). **Comp. Biochem. Physiol. A**, v. 148, S105, 2007.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1488, p. 1-19, 2000.

SOARES, A. M.; GIGLIO, J. R. Chemical modifications of phospholipases A2 from snake venoms: effects on catalytic and pharmacological properties, **Toxicon**, v. 42, p. 855-868, 2003.

SOARES, A. M.; FONTES, M. R. M.; GIGLIO, J. R. Phospholipase A2 myotoxins from *Bothrops* snake venoms: structure–function relationship. **Curr. Org. Chem.**, v. 8, p. 1677-1690, 2004.

SOARES, S. G.; OLIVEIRA, L. L. Venom-sweet-venom: N-linked glycosylation in snake venom toxins. **Protein Pept. Lett.**, v. 16, p. 913-919, 2009.

STABELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 12, p. 2881-2886, 2004.

STABELI, R. G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 132-140, 2007.

STILES, B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN, S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v. 29, p. 1129-1141, 1991.

STOCKER, K. F. **Medical Use of Snake Venom Proteins**, p. 33-57, CRC Press, Florida, 1990.

STOCKER, W. et al. The metzincins-topological and sequential relations between the astacins, adamalysins, serralysins, and matrixins (collagenases) define a superfamily of zinc-peptidases. **Protein. Sci.**, v. 4, p. 823-840, 1995.

STROKA, A. et al. Purification and characterization of a hemorrhagic metalloproteinase from *Bothrops lanceolatus* (Fer-de-lance) snake venom. **Toxicon**, v. 45, p. 411-420, 2005.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L-amino acid oxidase and hydrogen peroxide. **J. Biochem. Tokyo**, v. 125, p. 305-309, 1999.

SWENSON, S.; MARKLAND, J. R. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v. 45, p. 1021-1039, 2005.

TAN, N. H.; SAIFUDDIN, M. N. Isolation and characterization of an unusual form of L-amino acid oxidase from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Biochem. Int.**, v. 19, p. 937-944, 1989.

TEIXEIRA, C. F. et al. Inflammatory effects of snake venom metalloproteinases. **Mem. Inst. Oswaldo Cruz**, v.100(1), p. 181-184, 2005.

TEMPONE, A. G. et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania spp.* with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 208, p. 620-624, 2001.

THOMAZINI-SANTOS, I. A. et al. Surgical Adhesives. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.7, p.159-71, 2001.

TORII, S. et al. Molecular cloning and functional analysis of apoxin I, a snake venom-derived apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity. **Biochemistry**, v. 39, p. 3197-3205, 2000.

TORRES, A. F. C. et al. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. **J. Venomous Anim. Toxins incl. Trop. Dis.**, v. 16, p. 614-622, 2010.

TREVORS, J. T. Dehydrogenase activity in soil: a comparison between the INT and TTC assay. **Soil Biol. Biochem.**, v. 16(6), p. 673-674, 1984.

TRIKHA, M.; DE CLERCK, Y. A.; MARKLAND, F. S. Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Res.**, v. 54, p. 4993-4998, 1994.

ULLAH, A. et al. Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 421(1), p. 124-128, 2012.

ULLOA, J. et al. Nova Ocorrência da serpente *Bothrops leucurus* (SERPENTES; VIPERIDAE) na região de Caatinga de Poções e Brumado do estado da Bahia, Brasil. CD Room do I Congresso Brasileiro de Herpetologia. Curitiba, 2004.

VALERIANO-ZAPANA, J. A. et al. Functional and structural characterization of a new serine protease with thrombin-like activity TLBan from *Bothrops andianus* (Andean lancehead) snake venom. **Toxicon**, v. 59, p. 231-240, 2012.

VAN DEENEN, L. L. M.; DE HAAS, G. H. The substrate specificity of phospholipase A2. **Biochem. Biophys. Acta**, v. 70, p. 538-553, 1963.

VARANDA, E. A.; GIANNINI, M. J. S. M. Bioquímica de venenos de serpentes. In: BARRAVIERA, B. ed. **Venenos: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos**. EPUB, Rio de Janeiro, p. 205-223, 1999.

VARGAS, L. J. et al. An acidic phospholipase A2 with antibacterial activity from *Porthidium nasutum* snake venom. **Comp. Biochem. Physiol.**, v. 161(B), p. 341-347, 2012.

VIDAL, N. et al. The phylogeny and classification of caenophidian snakes inferred from seven nuclear protein-coding genes. **C. R. Biol.**, v. 330 p. 182-187, 2007.

VINCENT, A. Unravelling the pathogenesis of myasthenia gravis. **Nat. Rev. Immunol.**, v. 2, p. 797-804, 2002.

VOGEL, C. W. **Immunoconjugates. Antibody Conjugates in Radioimaging and Therapy of Cancer**. New York: Oxford University Press, 1987.

VOGT, W. **Snake Venom Constituents Affecting the Complement System**. Boca Raton: CRC Press, 1990.

VONK, F. J. et al. Evolutionary origin and development of snake fangs, **Nature**, v. 454, p. 630-633, 2008.

VONK, F. J. et al. Snake venom: From fieldwork to the clinic. **Bioessays**, v. 33(4), p. 269-279, 2011.

WARD, R. J. et al. Refolding and purification of Bothropstoxin-I, a Lys-49 phospholipase A2 homologue, expressed as inclusion bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expr. Purif.**, v. 21, p. 134-140, 2001.

WEISEL, J. W. Fibrinogen and fibrin. **Adv. Protein. Chem.**, v. 70, p. 247-299, 2005.

WELDON, C. L.; MACKESSY, S. P. Biological and proteomic analysis of venom from the Puerto Rican Racer (*Alsophis portoricensis*: Dipsadidae). **Toxicon**, v. 55, p. 558-569, 2010.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WOOD, S.; HILGARD, J. R. Arvin-induced hypofibrinogenemia and metastasis formation from blood-borne cancer cells. **Johns Hopkins Med. J.**, v. 133, p. 207-213, 1973.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics. **Toxicon**, v. 35, p. 319-340, 1997.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, No. 2. **Toxicon**, v. 36, p. 299-307, 1998.

WÜSTER, W.; GOLAY, P.; WARRELL, D. A. Synopsis of recent developments in venomous snake systematics, No. 3. **Toxicon**, v. 37, p. 1123-1129, 1999.

YANG, H. H. et al. Induced proteome of *Trichoderma harzianum* by *Botrytis cinerea*. **Mycol. Res.**, v. 113, p. 924-932, 2009.

ZELLER, A. E. Snake venom action: are enzymes involved in it? **Experientia**, v. 33, p. 143-150, 1977.

ZHANG, H. et al. Purification, partial characterization, crystallization and structural determination of AHP-LAAO, a novel L-amino-acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Cryst. D**, v. 60, p. 974-977, 2004.

ZHANG, Y. J. et al. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 309, p. 598-604, 2003.

ZHU, Z. et al. Crystal structures and amidolytic activities of two glycosylated snake venom serine proteinases. **J. Biol. Chem.**, v. 280, p. 10524-10529, 2005.