

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
Instituto de Ciências Biológicas
Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia

**Investigação de algumas atividades
biológicas da peçonha da serpente
Micrurus lemniscatus (Linnaeus, 1758)**

Thiago Geraldo Soares

Belo Horizonte
2015

THIAGO GERALDO SOARES

**Investigação de algumas atividades
biológicas da peçonha da serpente
Micrurus lemniscatus (Linnaeus, 1758)**

**Dissertação apresentada ao Programa de
Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia
do Instituto de Ciências Biológicas da
Universidade Federal de Minas Gerais como
pré-requisito para obtenção do título de
Mestre em Bioquímica e Imunologia.**

**Orientadora: Prof^a Dra. Maria Elena de Lima
Perez Garcia**

**Co-orientadoras: Dra. Márcia Helena Borges
Prof^a Dra. Suely Gomes de Figueiredo**

Belo Horizonte

2015

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a Deus, pela oportunidade concedida, por ter me abençoado, iluminado meus caminhos e me permitido vivenciar mais esta importante experiência!

À minha orientadora, Dra. Maria Elena de Lima Perez Garcia, pela oportunidade de ser seu orientando e por toda confiança, dedicação, delicadeza, compreensão, paciência e, principalmente, por todo apoio e suporte necessários para a realização deste projeto!

À minha co-orientadora, Dra. Márcia Helena Borges, por ter me recebido de braços abertos no Laboratório de Proteômica do Serviço de Bioquímica de Venenos Animais (FUNED) e por ter acompanhado passo a passo deste trabalho! Agradeço por todos os ensinamentos, conselhos e por toda compreensão e dedicação!

À minha co-orientadora, Dra. Suely Gomes de Figueiredo, pela ajuda indispensável neste projeto, pelos aprendizados, pelas valiosas discussões e pelo carinho e disponibilidade de sempre! Obrigado por ter me auxiliado em tantos experimentos, principalmente nas atividades hemaglutinante e hemolítica!

À Dra. Marta do Nascimento Cordeiro, pela atenção, colaboração e pelas lições ensinadas!

À Dra. Consuelo Latorre Fortes-Dias, por sempre me receber com muita atenção no Serviço de Enzimologia Aplicada (DPD/FUNED)! Agradeço por ter me auxiliado nos experimentos de atividade fosfolipásica e cross-linking, juntamente com a Msc Paula Ortolani! Agradeço à Ana Valentim, também deste serviço, pela disponibilidade em me ajudar!

À Dra. Marluce Oliveira e à pesquisadora Carmem Faria pela colaboração, apoio, suporte nos experimentos de atividade antimicrobiana realizados no Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas (DECD/FUNED)! Agradeço também à equipe deste serviço, em especial Elaine Nunes, Elaine Santana, Larissa e Paula por me auxiliarem no preparo das cepas bacterianas!

Ao Dr. Marcelo Bemquerer (EMBRAPA/DF), pela importante contribuição neste trabalho com as análises por espectrometria de massas e pela disponibilidade em nos auxiliar!

Ao Cláudio Fonseca de Freitas e ao Rômulo Righi de Toledo, assim como à equipe do Serviço de Animais Peçonhentos (DI/FUNED) por nos ceder, gentilmente, nosso objeto de estudo: a peçonha de *M. lemniscatus*!

À Dra. Fabiana Simão Machado, ao Dr. Eladio Oswaldo Flores Sanchez e ao Dr. Thiago Verano Braga por aceitarem participar da minha banca de defesa!

Ao Programa de Pós-Graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas-UFMG!

Às agências de fomento: Capes, CNPq e INCTTOX!

Aos amigos e colegas do Serviço de Bioquímica de Venenos Animais (DPD/FUNED), pela ajuda, companheirismo, incentivos e força diárias!

Agradeço de forma especial à Jaqueline dos Santos Leal, pela ajuda nas análises de massas, ao Rodrigo Barros, pela ajuda nos experimentos com células, e à Dayane Naves! Obrigado por me ajudarem também em outros experimentos e pelas discussões teóricas e práticas!

Aos colegas do Laboratório de Venenos e Toxinas Animais (ICB/UFMG), pelos direcionamentos, colaborações e instruções!

Ao Dr. Daniel dos Santos Moreira pela ajuda com os experimentos de lipossomos e pelas discussões sobre alguns resultados deste trabalho!

Ao Msc Pablo Victor Mendes dos Reis, pelo apoio e incentivo! Por ter estudado comigo para a prova de seleção do mestrado, por me apresentar o Laboratório de Venenos e Toxinas Animais e por me ensinar as técnicas dos ensaios antimicrobianos!

Às Msc Marcela Cristine Silva e Dr^a Micheline Donato, pelas diversas discussões sobre a peçonha de *M. lemniscatus*, objeto de estudo de nossos trabalhos!

Ao Márcio Lopes Silva, meu grande e melhor amigo! Agradeço pelo companheirismo, pelo apoio nos momentos de alegria e, também, de dificuldade e pelo incentivo de sempre!

Ao meus grandes amigos Pablo Silva Melo e João Carlos, pela amizade, apoio e incentivo no decorrer dessa trajetória!

À minha família, por sempre acreditar e torcer por mim, sobretudo minhas irmãs e irmãos Maria, Mailda, Maisa, William e Denilson e minhas sobrinhas Isabella e Kristhiana!!!

À Tia Terezinha, por me abençoar sempre!

Especialmente, agradeço aos meus amados pais, JOSÉ NOGUEIRA e MARGARIDA, pelo amor, carinho, dedicação, educação, apoio, bons exemplos, por serem minha inspiração! Muito obrigado pelos esforços imensuráveis para mais esta conquista!!!

MUITO OBRIGADO!!!

RESUMO

O estudo das peçonhas de serpentes é importante para o desenvolvimento de terapias contra acidentes ofídicos e também porque estas peçonhas são fontes de moléculas com potencial terapêutico, uma vez que podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e de outros produtos biotecnológicos. Neste contexto, no presente estudo, realizamos uma caracterização bioquímica parcial e investigamos algumas atividades biológicas da peçonha de *M. lemniscatus* e das frações obtidas por fracionamento por exclusão molecular (Superose 12). As frações (EM-F1 - EM-F11) obtidas foram submetidas à SDS-PAGE e à espectrometria de massas (MALDI-TOF), o que mostrou que a peçonha é composta principalmente, por componentes com massas moleculares de 6 - 8 kDa e 12 - 14 kDa. O “screening” de atividades biológicas demonstrou que a peçonha apresentou atividades fosfolipásica A₂ (EM-F3 a EM-F10), hialuronidásica (EM-F1 e EM-F2) e hemaglutinante (EM-F6 e EM-F7), além de ter induzido perda da adesão celular em adenocarcinoma de mama em cultura (EM-F1 e EM-F2). Adicionalmente, a peçonha induziu atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) (EM-F1 e EM-F2). Frente ao surgimento de bactérias super-resistentes aos antibióticos comerciais e ao interesse em investigar agentes antimicrobianos a partir de fontes naturais, isolamos e caracterizamos química e farmacologicamente, a enzima L-aminoácido oxidase, MI-LAAO. Esta enzima foi purificada por cromatografia de troca aniônica (Synchronpack AX300) e apresentou Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) de 1,56 µg/mL contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™). Adicionalmente, a toxicidade celular desta molécula foi avaliada em três linhagens celulares (THLE-2, WI26-VA4 e HEK-293), o que mostrou que esta não é tóxica para estas células quando testada nas concentrações de CIM/CBM obtidos contra *Staphylococcus aureus*. Além disso, MI-LAAO não causou hemólise em eritrócitos de coelho e não induziu lise de lipossomos. A análise por espectrometria de massas MALDI-TOF mostrou uma massa molecular aparente de aproximadamente 69 kDa para MI-LAAO. Nosso trabalho mostrou a primeira L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de *M. lemniscatus*. No entanto, novos estudos são necessários para caracterizar a

atividade enzimática de MI-LAAO e compreender seu mecanismo de ação em bactérias.

Palavras-chave: *Micrurus lemniscatus*, atividades biológicas, atividade antimicrobiana, MI-LAAO.

ABSTRACT

The study of snake venoms is useful to development of therapies against snakebites and these venoms are also source of molecules with therapeutic potential. Therefore it can be used as prototypes for the development of drugs and other biotechnological products. In this context, we performed a partial biochemical characterization and investigated some biological activities of *M. lemniscatus* venom and its fractions obtained by fractionation by size exclusion (Superose 12). The fractions (EM-F1 - EM-F11) obtained were submitted to SDS-PAGE and to mass spectrometry (MALDI-TOF) analysis. The results showed that this venom consists mainly of components with molecular weights of 6 - 8 kDa and 12 - 14 kDa. The screening of biological activities demonstrated that the venom displayed phospholipase A2 (EM-F3 to EM-F10), hyaluronidase (EM-F1 and EM-F2) and hemagglutinating (EM-F6 and EM-F7) activities and causes loss of cell adhesion in mammary adenocarcinoma in culture (EM-F1 and EM-F2). Additionally, this venom induced antimicrobial activity against *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) (EM-F1 and EM-F2). Due to the emergence of super-resistant bacteria to commercial antibiotics and to the interest in investigating antimicrobial agents from natural sources, we isolated and characterized chemically and pharmacologically MI-LAAO. This enzyme was purified by anion exchange chromatography (Synchropack AX300) and showed a Minimum Inhibitory Concentration (MIC) and a Minimum Bactericidal Concentration (MBC) of 1.56 µg/mL against *Staphylococcus aureus*, (ATCC® 6538™). In addition, cellular toxicity of this molecule was assessed in three cell lines (THLE-2, WI-26 VA4 and HEK-293), which showed that it is not toxic for these cells, when tested at the MIC/MBC concentrations obtained against *Staphylococcus aureus*. Furthermore, MI-LAAO did not cause hemolysis in rabbit erythrocytes and did not induce liposome lysis. The MALDI-TOF mass spectrometric analyses showed an apparent molecular mass of approximately 69 kDa to MI-LAAO. Our results showed the first L-amino acid oxidase isolated from the *M. lemniscatus* venom. However, more studies are need to characterize the enzymatic activity of MI-LAAO and to understand its mechanism of action in bacteria.

Keywords: *Micrurus lemniscatus*, biological activities, antimicrobial activity, MI-LAAO.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Distribuição mundial de serpentes peçonhentas	19
Figura 2. Incidência mundial de acidentes ofídicos por região	21
Figura 3. Incidência mundial de mortes por acidentes ofídicos, por região	21
Figura 4. Envenenamentos causados por serpentes de diferentes gêneros no Brasil	23
Figura 5. Processo de síntese de peçonhas de serpentes apresentando a glândula de peçonha e o esquema de síntese, nas células da glândula	24
Figura 6. A espécie <i>Micrurus lemniscatus</i>	28
Figura 7. Distribuição de massas moleculares em função da frequência em peçonhas de espécies de <i>Micrurus</i>	30
Figura 8: Perfil cromatográfico do fracionamento por exclusão molecular da peçonha de <i>M. lemniscatus</i>	50
Figura 9: Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE (12,5%) da peçonha e das frações de <i>M. lemniscatus</i> obtidas por cromatografia de exclusão molecular	52
Figura 10: Curva padrão para estimativa de massas moleculares	52
Figura 11: Histograma da distribuição de massas das frações	53
Figura 12: Curvas padrão de atividade fosfolipásica A2 das peçonhas de <i>M. lemniscatus</i> e <i>C. d. terrificus</i>	54
Figura 13: Ensaio da atividade fosfolipásica A2 da peçonha e das frações obtidas de fracionamento por exclusão molecular	55
Figura 14: Zimografia mostrando a atividade hialuronidásica da peçonha e das frações de <i>M. lemniscatus</i> obtidas de fracionamento por exclusão molecular	56
Figura 15: Atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de coelho (2,0%) da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> e de suas frações EM-F6 e EM-F7	57
Figura 16: Ação das frações EM-F1 e EM-F2, obtidas do fracionamento da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> sobre adenocarcinoma de mama	58
Figura 17: Perfil cromatográfico do fracionamento por exclusão molecular, mapeado de acordo com as atividades biológicas testadas	60

Figura 18: Perfil cromatográfico da segunda etapa do processo de purificação do MI-AM	61
Figura 19: Perfil cromatográfico da terceira etapa de purificação do MI-AM	62
Figura 20: Curva de atividade antimicrobiana da peçonha, fração EM-F1 e MI-AM de <i>M. lemniscatus</i> contra <i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 6538™)	63
Figura 21: Ensaio de viabilidade/citotoxicidade das células THLE-2, WI26-VA4 e HEK-293	64
Figura 22: Gráfico mostrando a viabilidade/citotoxicidade das células THLE-2, WI26-VA4 e HEK-293, submetidas ao tratamento com MI-AM, em concentrações crescentes	65
Figura 23: Efeito de MI-AM na liberação da sonda fluorescente calceína de lipossomos constituídos de L- α -fosfatidilcolina	66
Figura 24: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) e espectro de massas do componente antimicrobiano de <i>M. lemniscatus</i> (MI-AM)	67
Figura 25: Curva padrão para estimativa de massa molecular de MI-AM	68
Figura 26: Ensaio de <i>cross-linking</i> químico de MI-AM com BS ³ (suberato bis-[sulfosuccinimidil])	69
Figura 27: Curva padrão para estimativa de massas moleculares do MI-AM e seus oligômeros	70
Figura 28. Similaridades entre as sequências de MI-LAAO e BF-LAAO	71
Figura 29. Resumo esquemático do trabalho	81

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Dados epidemiológicos de acidentes ofídicos, por regiões brasileiras, em 2013	22
Tabela 2. Alguns componentes comuns de peçonhas de serpentes elapídicas e características gerais	25
Tabela 3. Recuperação proteica das frações obtidas do fracionamento da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> , por exclusão molecular	51
Tabela 4. Atividade fosfolipásica A2 das peçonhas de <i>M. lemniscatus</i> e <i>C. d. terrificus</i>	55
Tabela 5. Valores de CIM e CBM para peçonha e frações EM-F1 e EM-F2 contra <i>Staphylococcus aureus</i> ATCC 6538	59

LISTA DE ABREVIATURAS

3FTx Toxin three fingers / Toxina três dígitos

ACN Acetonitrila

ANOVA Análise de variância

ATCC American Type Culture Collection / Coleção de Microrganismos Norte Americana

BF-LAAO L-aminoácido oxidase de *Bungarus fasciatus*

BS₃ Suberato bis-[sulfosuccinimidil]

CBM Concentração Bactericida Mínima

Cc-LAAO L-aminoácido oxidase de *Cerastes cerastes*

CIM Concentração Inibitória Mínima

CR-LAAO, L-aminoácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma*

DAPI 4',6-diamidino-2-phenylindole

DMEM Dulbecco's Modified Eagle Medium / Meio Eagle Dulbecco modificado

DMSO Dimetilsulfóxido

EDTA Ethylene glycol tetraacetic acid / Ácido etilenodiaminotetraacético

ELISA Enzyme Linked Immuno Sorbent Assay / Ensaio Imunoadsorvente Ligado à Enzima

EM-F1 Exclusão molecular - fração 1

EM-F2 Exclusão molecular - fração 2

EM-F3 Exclusão molecular - fração 3

EM-F4 Exclusão molecular - fração 4

EM-F5 Exclusão molecular - fração 5

EM-F6 Exclusão molecular - fração 6

EM-F7 Exclusão molecular - fração 7

EM-F8 Exclusão molecular - fração 8

EM-F9 Exclusão molecular - fração 9

EM-F10 Exclusão molecular - fração 10

EM-F11 Exclusão molecular - fração 11

EMEM Eagle's Minimum Essential Medium / Meio essencial Eagle mínimo

EPM Erro padrão da média

EthD-1 Homodímero de etídio

FAD Flavin Adenine Dinucleotide / Dinucleotídeo de Flavina-Adenina

FUNED Fundação Ezequiel Dias

HEPES 4-2-hydroxyethyl-1-piperazine ethanesulfonic acid / Ácido etanosulfônico 4-2-hidroxi-etil piperazina-1

HPLC High Pressure Liquid Chromatography / Cromatografia Líquida de Alta Pressão

LAAO L-aminoácido oxidase

m/z massa/carga

MALDI Matrix-assisted laser desorption ionization / Ionização e desorção por laser assistida por matriz

MALDI-TOF (MS) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight mass spectrometry / Espectrometria de massa de tempo de voo de ionização e desorção por laser assistida por matriz

MALDI-TOF-TOF (MS) Matrix-assisted laser desorption ionization time-of-flight time-of-flight mass spectrometry / Espectrometria de massa de tempo de voo in tandem de ionização e desorção por laser assistida por matriz

MER Mobilidade eletroforética relativa

MH Caldo Mueller Hinton

MI-AM Componente antimicrobiano de *Micrurus lemniscatus*

MI-LAAO L-aminoácido oxidase de *Micrurus lemniscatus*

MS Espectrometria de massas

MS/MS Espectrometria de massa in tandem

MTT Metabolização de metiltiazoltetrazólio

Oh-LAAO L-aminoácido oxidase de *Ophiophagus hannah*

OMS Organização Mundial de Saúde

PAMs Peptídeos Antimicrobianos

PBS Phosphate buffered saline / Tampão fosfato salino

PLA2 Phospholipase A2 / Fosfolipase A2

SDS Sodium dodecyl sulfato / Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE Sodium dodecyl sulfato - polyacrylamide gel electrophoresis / Eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

SFB Soro fetal bovino

SVS Secretaria de Vigilância Sanitária

TFA Trifluoroacetic acid / Ácido trifluoroacético

TOF/TOF Time of light – time off light / Tempo de vôo – tempo de vôo

UFC Unidades formadoras de colônia

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Serpentes peçonhentas e o surgimento da peçonha	19
1.2. Epidemiologia	20
1.3. Componentes de peçonhas de serpentes	23
1.4. Serpentes da família Elapidae, gênero <i>Micrurus</i> e espécie <i>Micrurus lemniscatus</i>	27
1.5. Toxicidade da peçonha das serpentes do gênero <i>Micrurus</i>	28
1.6. Potencial biotecnológico das peçonhas de serpentes	31
2. OBJETIVOS	32
2.1. Objetivo Geral	32
2.2. Objetivos Específicos	32
3. MATERIAL E MÉTODOS	33
3.1. Obtenção da peçonha de <i>M. lemniscatus</i>	33
3.2. Fracionamento da peçonha de <i>M. lemniscatus</i>	33
3.3. Caracterização Bioquímica da peçonha e das frações obtidas por fracionamento por exclusão molecular	34
3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida	34
3.3.2. Análise da massa molecular das frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF) (inglês: Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight)	35
3.4. Caracterização farmacológica da peçonha e das frações obtidas por fracionamento por exclusão molecular	35
3.4.1. Atividade fosfolipásica A2 em gema incorporada ao ágar	35
3.4.1.1. Preparo da solução de gema de ovo	35
3.4.1.2. Preparo das placas de ágar contendo gema de ovo incorporada	36
3.4.1.3. Amostras utilizadas no ensaio	36
3.4.1.4. Condições do ensaio	36
3.4.2. Atividade hialuronidásica por zimografia	37

3.4.3. Atividade hemaglutinante e hemolítica sobre eritrócitos de coelho (2,0%)	37
3.4.3.1. Obtenção dos eritrócitos de coelho (2,0%)	37
3.4.3.2. Atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de coelho (2,0%)	38
3.4.3.3. Teste da susceptibilidade hemolítica de eritrócitos de coelho (2,0%)	38
3.4.4. Ação da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> e de suas frações sobre as células MACL-1 (adenocarcinoma de mama)	39
3.4.5. Atividade antimicrobiana da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> e de suas frações	40
3.4.5.1. Linhagens microbianas utilizadas	40
3.4.5.2. Crescimento e padronização das cepas bacterianas	40
3.4.5.3. Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da peçonha e das frações obtidas de fracionamento por exclusão molecular	40
3.5. Processo de purificação do componente antimicrobiano de <i>M. lemniscatus</i> (MI-AM)	41
3.5.1. Segunda etapa de purificação: Cromatografia de troca aniônica	41
3.5.2. Terceira etapa de purificação: Cromatografia de fase reversa analítica	42
3.6. Atividade antimicrobiana	43
3.6.1. Linhagens microbianas utilizadas	43
3.6.2. Crescimento e padronização das cepas bacterianas	43
3.6.3. Ensaio de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM)	43
3.7. Ensaio de Viabilidade/Toxicidade celular	44
3.7.1. Linhagens celulares e manutenção das culturas	44
3.7.2. Ensaio de citotoxicidade	44
3.7.3. Avaliação de viabilidade celular	44
3.7.4. Avaliação da viabilidade das linhagens celulares por microscopia de fluorescência	45
3.8. Ação da MI-AM sobre lipossomos L- α -fosfatidilcolina	46
3.9. Ensaio de <i>cross-linking</i>	46

3.10. Análise de MI-AM por espectrometria de massas MALDI- TOF- TOF.....	47
3.10.1. Remoção da coloração dos “spots”: Redução e Alquilação	47
3.10.2. Digestão e extração das proteínas	47
3.10.3. MALDI TOF-TOF MS/MS	48
3.11. Estimativa proteica	49
3.12. Análises estatísticas	49
4. RESULTADOS	50
4.1. Fracionamento da peçonha da serpente <i>M. lemniscatus</i>	50
4.2. Caracterização Química das frações obtidas de fracionamento da peçonha de <i>M. lemniscatus</i>	51
4.2.2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5%	51
4.3. Análise por espectrometria de massas das frações obtidas de fracionamento por exclusão molecular	53
4.3.1. Distribuição de massas (m/z) das frações	53
4.4. Caracterização de diferentes atividades da peçonha e das frações obtidas pelo fracionamento	54
4.4.1. Atividade fosfolipásica A2	54
4.4.2. Atividade hialuronidásica	56
4.4.3. Atividade hemaglutinante	56
4.4.4. Atividade hemolítica	57
4.4.5. Ação da peçonha de <i>M. lemniscatus</i> e de suas frações sobre células de adenocarcinoma de mama	58
4.4.6. Atividade antimicrobiana	59
4.5. Mapeamento das atividades biológicas induzidas pelas frações obtidas por exclusão molecular	59
4.6. Purificação do componente antimicrobiano de <i>M. lemniscatus</i> (MI-AM)	61
4.6.1. Segunda etapa de purificação: Cromatografia de troca aniônica	61
4.6.2. Terceira etapa de purificação: Cromatografia de fase reversa	62
4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana da MI-AM	63
4.8. Viabilidade/citotoxicidade celular do MI-AM	64

4.9. Atividade de MI-AM sobre lipossomos	65
4.10. Caracterização Química do MI-AM	66
4.11. Determinação da sequência de MI-AM	70
5. DISCUSSÃO	72
6. CONSIDERAÇÕES FINAIS	80
7. CONCLUSÃO GERAL	80
8. PERSPECTIVAS	83
9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	84

1. INTRODUÇÃO

1.1. Serpentes peçonhentas e o surgimento da peçonha

As serpentes pertencem à classe Reptilia, ordem Squamata e subordem Serpentes. São encontradas em todos os continentes, com maior incidência em regiões tropicais e temperadas (PYRON *et al.*, 2013). Atualmente são registradas, aproximadamente, 3400 espécies de serpentes sendo que cerca de 600 são peçonhentas e destas, mais de 200 são de importância médica (Figura 1) (OMS, 2010; UETZ, 2013).



Figura 1. Distribuição mundial de serpentes peçonhentas. Organização Mundial de Saúde. Disponível em: <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>.

A peçonha surgiu na história dos Squamatas a cerca de 200 milhões de anos atrás (FRY *et al.*, 2012). É uma característica ancestral comum para as subordens Serpentes, Iguania e Anguimorpha, motivo pelo qual pertencem ao clado monofilético Toxicofera (FRY *et al.*, 2009). A complexidade, especialização e variabilidade das peçonhas de serpentes contribuiu para a diversificação deste grupo na era Cenozoica, um período de grandes modificações na Terra, o que é explicado pela evolução independente entre as linhagens divergentes filogeneticamente (FRY *et al.*, 2009). Os componentes das peçonhas foram originados a partir do processo de duplicação gênica das moléculas ancestrais e pela expressão seletiva do novo gene em um novo tecido, gerando famílias multigênicas específicas de moléculas com novas funções. Assim, novas atividades biológicas foram adquiridas pelos componentes (processo de neofuncionalização),

contribuindo para a variabilidade das peçonhas ao longo da evolução (FRY *et al.*, 2009).

Serpentes peçonhentas pertencem à superfamília Colubroidea e fazem parte do clado Caenophidia, onde seus representantes são chamados de “serpentes modernas”. Essas são organizadas em sete famílias, incluindo Elapidae e Viperidae, as maiores responsáveis pelos envenenamentos humanos (VIDAL *et al.*, 2005; PYRON *et al.*, 2011).

1.2. Epidemiologia

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS), os envenenamentos causados por serpentes peçonhentas representam um grave problema de saúde pública, e, desde 2009, foram considerados, pela OMS, como uma condição tropical negligenciada (KASTURIRATNE *et al.*, 2008; WILLIAMS *et al.*, 2010). O padrão epidemiológico desses acidentes mantém-se inalterado nos últimos 100 anos e a população mais afetada são, principalmente, homens adultos que trabalham na agricultura e suas crianças, habitantes de comunidades rurais de baixa renda, de países tropicais em desenvolvimento. Os acidentes ocorrem principalmente durante o dia, afetando preferencialmente os membros inferiores (GUTIÉRREZ, 2006).

Apesar do sistema de notificações de envenenamentos por serpentes ser deficitário, estima-se que ocorram, anualmente, cerca de 2.500.000 envenenamentos e 125.000 mortes em todo o mundo (CHIPPAUX, 2008). Em 2007, foram estimados mais de 1,8 milhões de acidentes ofídicos no mundo, os quais ocorreram, predominantemente, na Ásia, África, América Central e América do Sul, principalmente em áreas agrícolas de países de média e baixa renda, onde há pouco investimento público em saúde (Figuras 2 e 3) (KASTURIRATNE, 2008; HARRISON, 2011).

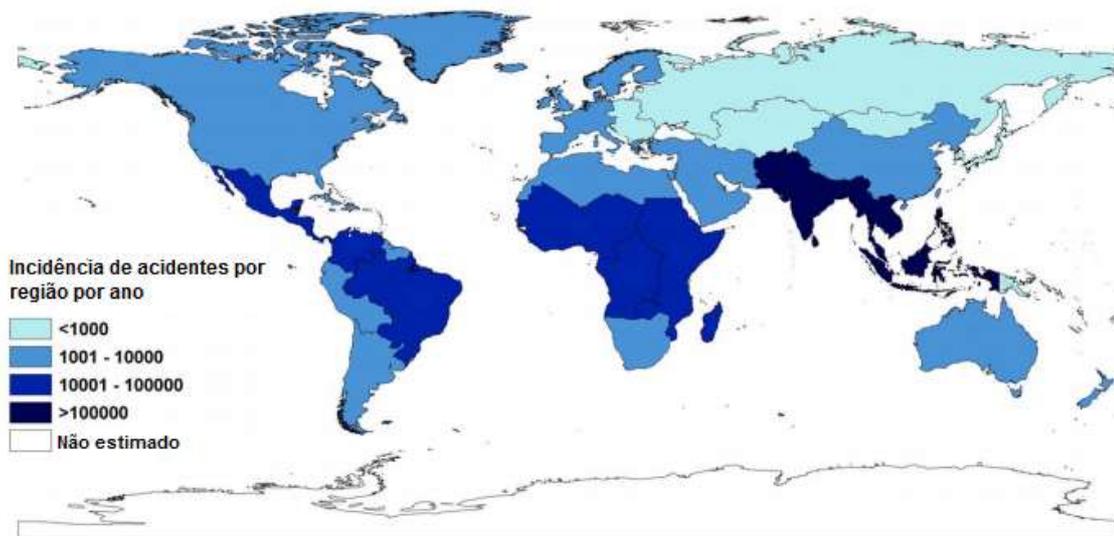


Figura 2. Incidência mundial de acidentes ofídicos por região. Fonte: Adaptado de Kasturiratne, *et al* (2008).

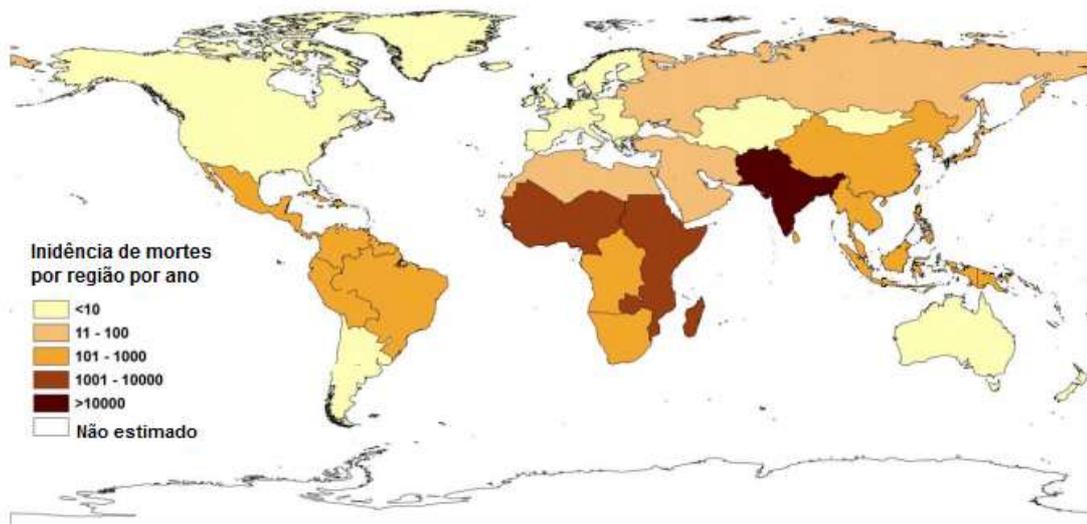


Figura 3. Incidência mundial de mortes por acidentes ofídicos, por região. Fonte: Adaptado de Kasturiratne, *et al* (2008).

A incidência e frequência dos acidentes ofídicos é variável entre os países e entre as regiões de um país, pois depende de diferentes fatores, tais como a distribuição das serpentes envolvidas, o clima, os parâmetros ecológicos, a biodiversidade, a densidade populacional humana, os tipos de habitações e as atividades econômicas. Também as taxas de mortalidade podem variar de acordo com as serpentes envolvidas no acidente, a variabilidade intraespecífica na composição das peçonhas, as dificuldades geográficas, o tempo de transferência de

indivíduos acidentados para hospitais e o acesso a tratamentos médicos e soros antiofídicos adequados (OTERO-PATINO, 2009).

Segundo dados epidemiológicos registrados no ano de 2013 pela Secretaria de Vigilância Sanitária (SVS), a incidência dos acidentes ofídicos no Brasil foi de 13,8 casos/100.000 habitantes. Porém, os maiores registros de casos de acidentes ofídicos e óbitos foram na região Norte, com uma incidência de 55,6 casos/100.000 habitantes (Tabela 1) (BRASIL, 2014). Esta região apresenta fatores que contribuem para a alta ocorrência de acidentes com serpentes, como clima mais quente e úmido, ampla biodiversidade, presença de áreas rurais e comunidades ribeirinhas. E o número de óbitos se deve principalmente à dificuldade no tratamento, acentuado pela falta de infraestrutura relacionada ao transporte da vítima e acesso aos soros antiofídicos (WALDEZ *et al.*, 2009).

Tabela 1. Dados epidemiológicos de acidentes ofídicos, por regiões brasileiras, em 2013.

Região	Casos	Incidência (100.000 hab)	Óbitos
Norte	8.717	55,6	45
Nordeste	5.553	11,2	32
Sudeste	6.720	8,4	13
Sul	2.111	7,9	8
Centro-Oeste	2.201	17,3	10
Brasil	25.302	13,8	108

Fonte: Adaptado de Sinan/SVS/MS – última atualização em 12/05/2014.

Os gêneros *Micrurus* (família Elapidae), *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (família Viperidae) incluem as serpentes com maior importância médica no Brasil uma vez que estas são responsáveis pelos envenenamentos de maior gravidade (BRASIL, 2014). De acordo com estudos epidemiológicos realizados por Chippaux (2015), não houve variação regional na distribuição dos gêneros envolvidos nos envenenamentos, com exceção para o gênero *Lachesis*, o qual apresentou alta incidência na região Norte (9% *versus* menos que 1% nas outras regiões). O gênero *Bothrops* foi responsável por cerca de 70% dos envenenamentos, seguido pelo gênero *Crotalus* variando de 7-11% de acordo com a região avaliada. O gênero *Micrurus* representou menos que 1% dos acidentes em todas as regiões do país. Em

cerca de 15% dos envenenamentos a serpente não foi identificada. Estes dados estão resumidos na figura 4.



Figura 4. Envenenamentos causados por serpentes de diferentes gêneros no Brasil.

Fonte: adaptado de Chippaux (2015).

Em relação aos sintomas resultantes dos envenenamentos por estas serpentes, os causados por serpentes da família Viperidae (principalmente por *Bothrops* e *Crotalus*) são caracterizados por lesões locais graves, hemorragia, mionecrose e alterações homeostáticas. Já os acidentes causados por serpentes do gênero *Micrurus*, apesar de ocorrerem em menor proporção, são extremamente graves e letais, apresentando, principalmente, efeitos neurotóxicos e cardiotoxicos. (LEÃO *et al.*, 2009; CASEWELL *et al.*, 2009).

1.3. Componentes de peçonhas de serpentes

As serpentes peçonhentas apresentam um sistema de síntese, estoque e injeção de peçonha bem desenvolvido, com uma glândula especializada cercada por músculos. As peçonhas são sintetizadas e metabolizadas em células secretoras da glândula de peçonha onde são, normalmente, transportadas por sistemas de endomembrana até a liberação de seus componentes no lúmen, por meio de vesículas secretoras (Figura 5) (BRAHMA *et al.*, 2015). O desenvolvimento do aparato peçonhento durante a contínua evolução das serpentes foi fundamental para o surgimento de componentes biologicamente ativos e potencialmente tóxicos,

utilizados na defesa e alimentação destes animais (CALVETE *et al.*, 2009; FRY *et al.*, 2009; TASHIMA, 2012).

As peçonhas de serpentes são secreções tóxicas constituídas por uma variedade de componentes biologicamente ativos, incluindo peptídeos, proteínas, aminoácidos, moléculas orgânicas e inorgânicas, que podem atuar isoladamente ou sinergicamente, intensificando as diversas funções biológicas, bioquímicas e farmacológicas das peçonhas (CALVETE *et al.*, 2009; FRY *et al.*, 2009). Os polipeptídeos, por sua vez, são classificados em dois grupos distintos: enzimáticos e não-enzimáticos. Baseando-se em suas estruturas, estes componentes podem ser agrupados em superfamílias, dentre as quais destacam-se as neurotoxinas, fosfolipases A2, metaloproteinases, hialuronidases, lectinas do tipo C, L-aminoácido oxidases, desintegrinas, dentre outros (KANG *et al.*, 2011). A tabela 2 apresenta os componentes mais comuns de peçonhas de serpentes elapídicas.

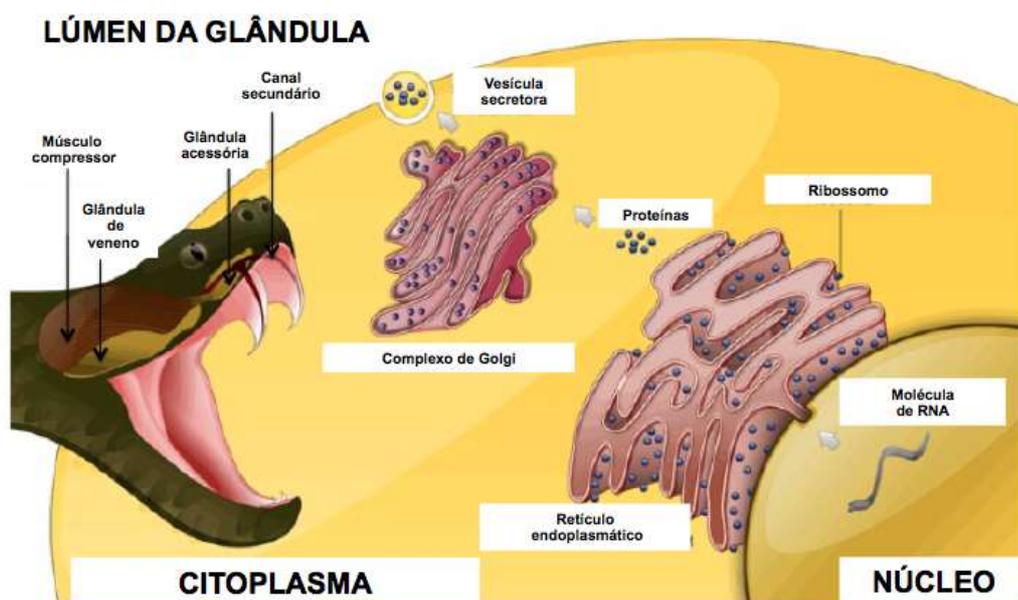


Figura 5. Processo de síntese de peçonhas de serpentes apresentando a glândula de peçonha e o esquema de síntese, nas células da glândula. Fonte: Adaptado de De Oliveira Junior *et al* (2013).

Tabela 2. Alguns componentes comuns de peçonhas de serpentes elapídicas e características gerais.

Componente	Massa molecular (kDa)	Função	Atividade biológica
Componentes enzimáticos			
Fosfodiesterase	94-140	Hidrólise de ácidos nucleicos e nucleotídeos	Depleção de di- e trinucleotídeos; hipotensão/choque
5'-nucleotidase	53-82	Hidrólise de 5'-nucleotídeos	Liberação de nucleosídeo
Alcalina-fosfomonoesterase	90-110	Hidrólise de pontes de fosfomonoesterase	_____
Acetilcolinesterase	55-60	Hidrólise de acetilcolina	Inativação ou remoção de acetilcolina
Hialuronidase	73	Hidrólise de ácido hialurônico intersticial	Diminuição da viscosidade intersticial; difusão dos componentes da peçonha
L-aminoácido oxidase (homodimérica)	50-150	Desaminação oxidativa de L-aminoácidos	Indução de apoptose; danos celulares
Ativadores de protrombina			
Grupo C	>250	Ativador do fator VII ou fator X	Alta toxicidade
Grupo D	45-58	Ativação do fator X	
Grupo A	45	Ativação do fator X	
Metaloproteinases (P-III)	43-70	Hidrólise de muitas proteínas estruturais, incluindo componentes da lâmina basal	Hemorragia, mionecrose, pré-digestão da presa
Fosfolipases A2 (grupo I)	13-15	Hidrólise Ca ²⁺ - dependente de grupo 2-acil 3-sn-fosfoglicerídeos	Miotoxicidade, mionecrose, danos em membranas lipídicas

Componente	Massa molecular (kDa)	Função	Atividade biológica
Componentes não-enzimáticos			
Lectinas do tipo-C	27-32	Liga-se à plaquetas e ao receptor de colágeno	Anticoagulante; modelador plaquetario
Desintegrinas	5,2-15	Inibe os ligantes de integrinas	Inibição plaquetária
Proteínas secretoras ricas em cisteína (CRiSPs)	21-29	Possíveis bloqueadores cNTP- canais	Indução de hipotermia, imobilização da presa
Fatores de crescimento de nervosa	14-32,5	Promove crescimento da fibra nervosa	Apoptose
PLA2 Neurotóxicas pré-sinápticas	13-80	Bloqueadores de acetilcolina para terminais do axônio	Potente neurotoxicidade; imobilização da presa
Toxinas três-dígitos, cardiotoxinas, fasciculinas, etc.	6-9	Potentes inibidores da transmissão neuromuscular, função cardíaca, acetilcolinesterase, etc.	Rápida imobilização da presa, paralisia, morte
Componentes orgânicos menores			
Purinas e pirimidinas	AMP= 0.347, hipoxantina, inosina	Amplo efeito em múltiplas linhagens celulares	Hipotensão, paralisia, apoptose, necrose e imobilização da presa

Fonte: Adaptado do livro Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles (2010).

1.4. Serpentes da família Elapidae, gênero *Micrurus* e espécie *Micrurus lemniscatus*

A família Elapidae possui cerca de 250 espécies, distribuídas a partir do Sudeste e sudoeste dos Estados Unidos, do México, América Central e América do Sul, e também são encontrados na Ásia, África e Austrália, onde são representadas pelos gêneros *Naja*, *Bungarus* e *Oxyuranus* (CAMPBELL & LAMAR, 2004). As “cobras corais” são os membros representantes desta família nas Américas, a qual é dividida nos gêneros *Leptomicrurus*, *Micruroides* e *Micrurus*, sendo o último o mais diversificado, reunindo mais de 70 espécies e 120 subespécies (AIRD, 1991; ALAPE-GIRON *et al.*, 1994; MELGAREJO, 2003; COSTA & BÉRNILES, 2014).

As serpentes do gênero *Micrurus* são distribuídas do sul dos Estados Unidos ao Sul da América do Sul. No Brasil, existem 36 espécies e subespécies amplamente dispersas pelas regiões da Mata Atlântica, Cerrado, nordeste, sudeste, as quais habitam florestas abertas e úmidas, assim como ambientes antropizados (GIRAUDO & SCROCCHI, 2002; CAMPBELL & LAMAR, 2004; COSTA & BÉRNILES, 2014). As espécies mais comuns distribuídas no território brasileiro são *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca*, *M. lemniscatus*, *M. spixii* e *M. surinamensis* (TANAKA *et al.*, 2010; COSTA & BÉRNILES, 2014).

As espécies do gênero *Micrurus* possuem um padrão de cor disposto em anéis corporais, combinando o vermelho, preto e amarelo ou branco (CAMPBELL & LAMAR, 2004). Possuem denticção proteróglifa, ou seja, as presas inoculadoras de peçonha são ocas e de tamanho pequeno (VIDAL, 2002). Alimentam-se, geralmente, de pequenas serpentes, lagartos e anfisbenídeos; certas espécies possuem hábitos nutricionais especializados e se alimentam de peixes e outros invertebrados. A maioria das serpentes deste gênero tem hábitos terrestres e/ou subfossoriais. (SAZIMA, 1991; CAMPBELL & LAMAR, 2004).

A espécie *Micrurus lemniscatus* (LINNAEUS, 1758) está distribuída em todas as regiões do Brasil, onde são registradas 4 subespécies: *M. l. lemniscatus*, *M. l. carvalhoi*, *M. l. diutius*, *M. l. helleri* (MELGAREJO, 2003; COSTA & BÉRNILES, 2014). Esta espécie apresenta porte maior em relação às outras *Micrurus*, atingindo 1,5 metros de comprimento (figura 6A). Outra característica fisiomorfológica é a presença de uma faixa internasal branca sobre o focinho de coloração preta. Além

disso, possuem cabeça oval, pescoço curto (adaptado à escavação) e ausência de fosseta loreal (Figura 6B).

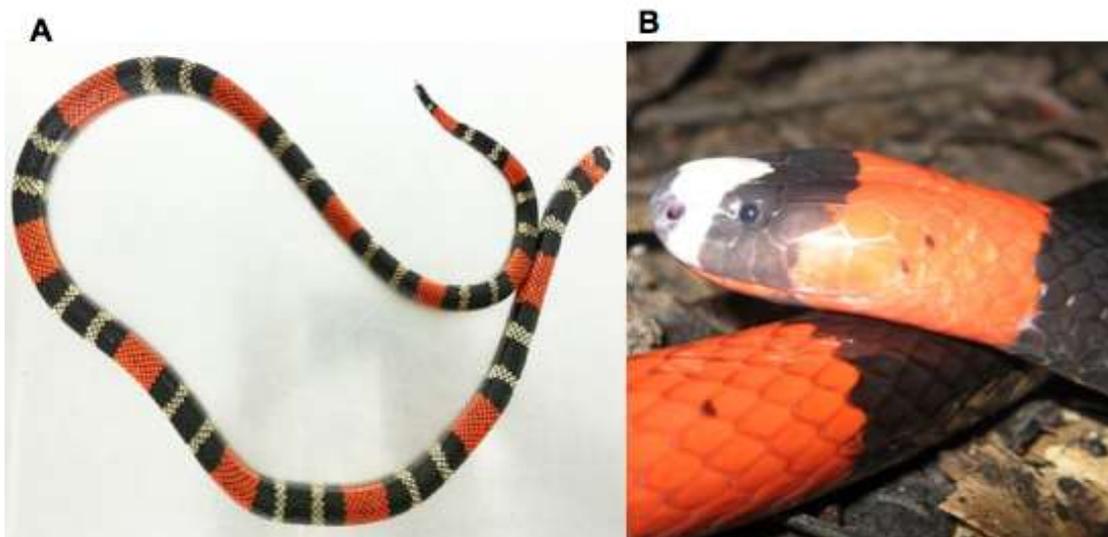


Figura 6. A espécie *Micrurus lemniscatus*. (A) Fotografia de uma espécime de *M. lemniscatus* (Arquivo pessoal); (B) Detalhes da cabeça de *M. lemniscatus* (Retirado de www.herpetofauna.com.br/Corais.htm, acesso em 24/08/2015).

1.5. Toxicidade da peçonha das serpentes do gênero *Micrurus*

O envenenamento humano causado por serpentes do gênero *Micrurus*, apesar de ser relativamente raro, apresenta efeitos potenciais diversos e complexos, devido a sua elevada toxicidade. É estimado que 5 mg de peçonha possa ser letal para seres humanos e, geralmente, esta letalidade elevada é atribuída à paralisia respiratória de origem periférica (VITAL BRAZIL, 1990; MANOCK, 2008).

Neurotoxicidade, miotoxicidade e lesões locais são os efeitos predominantes induzidos por estas peçonhas, uma vez que atuam sobre a junção neuromuscular periférica, bloqueando a transmissão nervosa (BARROS, 1994; GUTIÉRREZ *et al.*, 1983). Entretanto, efeitos cardiotoxicos, hemolíticos, hemorrágicos e edematogênicos também tem sido constatados. Estes efeitos são devidos às ações bioquímicas e farmacológicas dos diferentes componentes das peçonhas de *Micrurus*, tais como as toxinas três-dígitos (do inglês *three fingers* - 3FTx) e fosfolipases A2 (PLA2), assim como de hialuronidases, L-aminoácido oxidase (LAAOs), fosfodiesterases, dentre outros. Além disso, estudos revelaram que,

peçonhas de algumas espécies de *Micrurus*, apresentaram efeitos anticoagulantes, porém, com baixa ou nenhuma atividade proteolítica (AIRD & JORGE DA SILVA JR, 1991; TAN & PONNUDURAI, 1992; TANAKA *et al.*, 2010).

Os sintomas clínicos, observados em pacientes acometidos por este tipo de envenenamento, são ptose palpebral, distúrbios visuais, oftalmoplegia, paralisia dos músculos da mandíbula, da laringe e da faringe, dificuldade na fala e na deglutição, salivação, sialorréia, paralisia dos músculos do pescoço e dos membros, hemorragia interna, incontinência urinária e coagulopatia. Em casos graves, podem ocorrer parada respiratória e cardíaca, levando à morte (DA SILVA *et al.*, 2001). Portanto, os efeitos relativos à neurotoxicidade são predominantes, dentre os demais.

Os efeitos neurotóxicos avaliados em peçonhas de algumas espécies *Micrurus*, são resultantes de mecanismos de α -neurotoxinas com atividades pré-sinápticas e pós-sinápticas (CECCHINI *et al.*, 2005). Na atividade pré-sináptica, as α -neurotoxinas são caracterizadas por sua atividade fosfolipásica A2, provocando a inibição da liberação de acetilcolina nas terminações nervosas motoras (DOLEY *et al.*, 2010). Por outro lado, na atividade pós-sináptica, as α -neurotoxinas podem ser caracterizadas como toxinas do tipo *three fingers* sem atividade enzimática, bloqueando os receptores colinérgicos da placa terminal (HEDGE *et al.*, 2010). Neurotoxinas pós-sinápticas já foram isoladas das peçonhas de *M. frontalis* e *M. surinamenses*, enquanto a peçonha de *M. corallinus*, apresenta tanto atividades pré-sinápticas quanto pós-sinápticas. Diferentemente na peçonha de *M. lemniscatus* há somente atividade pós-sináptica (VITAL BRAZIL, 1987; SILVA JR.; BUCARETCHI, 2003; CECCHINI *et al.*, 2005). Além disso, nos peçonhas das espécies *M. fulvius* e *M. nigrocinctus*, foram encontradas cardiotoxinas e PLA2 miotóxicas que bloqueiam os receptores colinérgicos da placa terminal e despolarizam a membrana da fibra muscular (VITAL BRAZIL, 1990).

Os estudos e a caracterização de muitos componentes das peçonhas das espécies de *Micrurus* são escassos devido às dificuldades na caracterização correta das espécies, à captura e manutenção de espécimes em cativeiro e às pequenas quantidades de peçonha extraída dessas serpentes. Portanto, a maioria das propriedades farmacológicas e bioquímicas destes componentes, continua pouco compreendida.

A proteômica e a transcriptômica têm contribuído para o conhecimento da composição de peçonhas de algumas espécies de *Micrurus*, através de estudos

comparativos. Os componentes mais abundantes e diversificados nas peçonhas de *M. altirostris*, *M. corallinus*, *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* são as α -neurotoxinas (3FTxs) e as fosfolipases A2 (PLA2). Em contrapartida, as PLA2 são os componentes que estão em maior concentração na peçonha de *M. nigrocinctus*. Ciscotto e colaboradores, em 2011, demonstraram que componentes com massas moleculares entre 6-8 kDa são os mais frequentes nas peçonhas de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* (Figura 7). Além disso, outras famílias de proteínas foram encontradas em peçonhas de algumas *Micrurus*, como metaloproteínas, serino proteases, L-aminoácido oxidases, lectinas tipo C, lectinas tipo C-like, nucleotidases, toxinas muscarínicas-like e bungarotoxinas-like e lipases (OLAMENDI-PORTUGAL *et al.*, 2008; DOKMETJIAN *et al.*, 2009; FERNANDEZ *et al.*, 2011; CISCOTTO *et al.*, 2011).

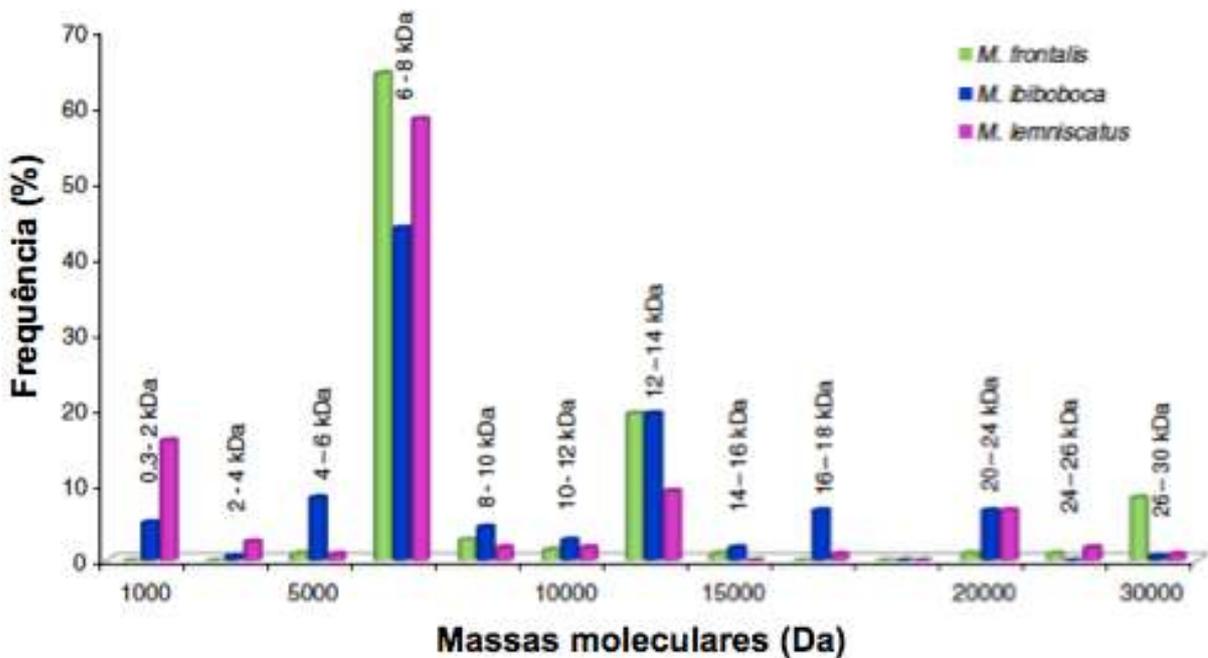


Figura 7. Distribuição de massas moleculares em função da frequência em peçonhas de espécies de *Micrurus*. As massas moleculares mais abundantes nas peçonhas de *M. frontalis*, *M. ibiboboca* e *M. lemniscatus* (6-8 kDa) correspondem às *three fingers* (3FTxs). Fonte: adaptado de Ciscotto *et al.*, 2011.

1.6. Potencial biotecnológico das peçonhas de serpentes

A grande diversidade química disponível em fontes naturais, faz com que estas possam ser utilizadas como provedoras de ferramentas (moléculas) úteis para a descoberta de novos fármacos e para o desenvolvimento de terapias, contra inúmeras doenças. As peçonhas de serpentes, por exemplo, são constituídas por uma mistura complexa de componentes químicos bioativos, como proteínas e peptídeos, com ampla variabilidade estrutural e funcional, adquiridas ao longo da evolução (DA SILVA *et al.*, 2014).

Se, de um lado peçonhas de serpentes podem causar danos irreparáveis quando inoculadas num ser vivo, por outro, alguns de seus componentes podem apresentar efeitos terapêuticos, quando purificados e bem caracterizados. Estes componentes apresentam atividades biológicas seletivas e atuam isolada- ou sinergicamente, podendo se ligar a alvos celulares específicos. Alguns componentes, em geral peptídeos ou proteínas, por exemplo, podem interferir diretamente em receptores ou canais iônicos, provocando alterações nos sistemas nervoso central e periférico, cardiovascular e neuromuscular, assim como alterações sobre a cascata de coagulação sanguínea e homeostase (CALVETE *et al.*, 2011; DA SILVA *et al.*, 2014).

Assim, as peçonhas de serpentes são valiosas fontes de componentes que podem ser utilizados em estudos bioquímicos, fisiológicos e patológicos, contribuindo para o desenvolvimento de terapias contra envenenamentos e para a descoberta de potenciais medicamentos e produtos biotecnológicos.

Face à pouca informação disponível na literatura, sobre a peçonha de *Micrurus lemniscatus*, neste trabalho propusemos a caracterização de diferentes atividades desta peçonha, como atividade fosfolipásica A2, hialuronidásica, hemaglutinante, hemolítica, antimicrobiana, bem como sua ação sobre células de adenocarcinoma de mama em cultura.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

O presente trabalho teve como objetivo geral fracionar a peçonha da serpente *M. lemniscatus* buscando-se caracterizar algumas de suas atividades biológicas.

2.2. Objetivos Específicos

- Fracionar a peçonha de *M. lemniscatus* por cromatografia líquida de alta performance (do inglês, High Pressure Liquid Chromatography, HPLC);
- Estimar as massas moleculares das frações obtidas na HPLC, por SDS-PAGE e por espectrometria de massas;
- Avaliar a ação da peçonha e de suas respectivas frações, para as atividades:
 - Fosfolipásica A2;
 - Hialuronidásica;
 - Hemaglutinante;
 - Hemolítica;
 - Ação sobre cultura de células MACL-1 (adenocarcinoma de mama);
 - Antimicrobiana contra algumas cepas de importância médica;
- Purificar o(s) componente(s) antimicrobiano(s), se encontrada tal atividade;
- Avaliar a atividade antimicrobiana, determinando: Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM), do(s) possível(eis) componente(s) obtido(s);
- Avaliar a viabilidade/citotoxicidade de células hepáticas humanas (THLE-2), fibroblastos humanos (WI26-VA4) e células renais humanas (HEK-293), tratadas com o(s) componente(s) obtido(s);
- Avaliar a ação do(s) componente(s) de interesse, sobre lipossomos;
- Caracterizar quimicamente (massas moleculares e sequências parciais) do(s) componente(s) de interesse, por SDS-PAGE e espectrometria de massas;
- Buscar identificar o(s) componente(s) de interesse, por similaridade com sequências depositadas em banco de dados.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Obtenção da peçonha de *M. lemniscatus*

A peçonha de serpentes da espécie *M. lemniscatus*, extraída de diferentes espécimes, machos e fêmeas, foi cedida gentilmente, pelo Serviço de Animais Peçonhentos da Fundação Ezequiel Dias (FUNED, Belo Horizonte, Brasil). Após a extração, a pool de peçonha foi liofilizado e, em seguida, armazenado em freezer a -20 °C.

3.2. Fracionamento da peçonha de *M. lemniscatus*

O fracionamento da peçonha foi realizado no Laboratório de Proteômica da Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento (FUNED, Belo Horizonte, Brasil).

Para a primeira etapa, cerca de 6,0 mg da peçonha liofilizada foram dissolvidos em 0,2 mL de tampão bicarbonato de amônio (0,05 M) pH 7,8 e centrifugados a 10.000 g por 10 minutos à 4°C. O sobrenadante límpido obtido foi aplicado em coluna de exclusão molecular Superose 12 HR (1,0 x 30 mL), previamente equilibrada com o mesmo tampão. A coluna foi acoplada ao sistema de HPLC (High Pressure Liquid Chromatography) no equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare), controlado pelo software UNICORN 5.11. A amostra foi eluída à temperatura ambiente e coletada em coletor de frações no volume de 0,5 mL por tubo, num fluxo de 0,5 mL/min. A corrida foi monitorada em absorbância de 280 nm. Após análise do perfil cromatográfico, o conteúdo dos tubos correspondentes a cada fração foram reunidos. As frações foram liofilizadas e armazenadas a -80 °C até serem submetidas à experimentos posteriores.

O cálculo de recuperação proteica foi feito a partir dos valores de absorbância a 280 nm (conforme ítem 3.11), considerando que cada unidade de absorbância é equivalente a 1,0 mg de proteína.

A peçonha e as frações obtidas foram submetidas a eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida e à análise por espectrometria de massas MALDI-TOF para avaliar e confirmar o perfil de massas moleculares.

Todos os reagentes utilizados neste trabalho foram de grau analítico.

3.3. Caracterização Bioquímica da peçonha e das frações obtidas por fracionamento por exclusão molecular

3.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida

A determinação da massa molecular aparente das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida conforme descrito por Laemmli (1970), utilizando-se um sistema de eletroforese com placas de 10 cm de comprimento por 8,2 cm de largura. O géis de separação e empilhamento utilizados foram de 12,5% e 4%, respectivamente.

As amostras contendo 15 µg de proteínas foram ressuspendidas em tampão de amostra (1,0 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,8 mL de Glicerol; 1,6 mL de SDS 10%; 0,4 mL de água destilada), na ausência de agente redutor (β -mercaptoetanol) e incubadas durante 3 a 5 min, em água fervente. Em seguida, cerca de 20 µL desta suspensão foram aplicados no gel, na canaleta correspondente. Paralelamente, padrões de massa molecular, ressuspendidos no mesmo tampão, foram aplicados em outra canaleta. As massas moleculares utilizadas como padrão foram (em kDa) 180, 115, 82, 64, 49, 37, 26, 19, 15 e 6 (BenchMark™/Invitrogen). A corrida foi realizada a 50V para a primeira hora e a 150V por cerca de mais uma hora, em fonte para eletroforese EPS 200 (Pharmacia Biotech).

Após a corrida o gel foi corado com Coomassie Blue R-250 (0,1% em 40% de metanol, 10% de ácido acético glacial) e o descoramento foi realizado com solução de metanol, ácido acético e água (1:2:19). As bandas de proteínas foram detectadas por coloração azul.

A mobilidade eletroforética relativa de cada proteína padrão foi determinada de acordo com a distância (cm). A curva padrão, para determinação da massa molecular aparente, foi traçada tendo como base com os logaritmos dos valores das massas moleculares dos padrões e as distâncias de migração de cada um.

3.3.2. Análise da massa molecular das frações obtidas na cromatografia de exclusão molecular por Ionização e Dessorção a Laser Assistida por Matriz (MALDI-TOF) (inglês: Matrix-assisted laser desorption/ionization – time of flight)

As massas moleculares foram identificadas por espectrometria de massas MALDI-TOF MS, no equipamento AutoFlex III Smartbeam (Bruker Daltonics), operado pelo software FlexControl 3.3 (Bruker Daltonics). As amostras foram misturadas com soluções supersaturadas das matrizes α -ciano-4-hidroxicinâmico (Bruker Daltonics) (5 mg/mL em 70% ACN : 30% 0,1% TFA/H₂O), ácido sinapínico (Bruker Daltonics) (5 mg/mL em 40% ACN : 60% 0,1% TFA/H₂O) e ácido 2,5-diidroxibenzoico (Bruker Daltonics) (5 mg/mL em 20% ACN : 80% 0,1% TFA/H₂O) na proporção de 1:1 (v/v), com o objetivo de avaliar o perfil de massas moleculares em todas as faixas. As amostras foram aplicadas manualmente em placa de MALDI (MTP AnchorChip TM var/384 T F, n° série 20416) e deixadas secar à temperatura ambiente. Para calibração do equipamento, foram utilizados padrão para peptídeo na faixa de 1000 - 4000 Da (Bruker Daltonics), padrão para proteínas na faixa de 5000 - 17500 Da (Bruker Daltonics) e padrão para proteínas na faixa de 20.000 - 70.000 Da (Bruker Daltonics). A obtenção dos espectros de massas foi realizada em modo positivo linear ou refletido. Os resultados foram analisados através do software FlexAnalysis 3.3 (Bruker Daltonics).

3.4. Caracterização farmacológica da peçonha e das frações obtidas por fracionamento por exclusão molecular

3.4.1. Atividade fosfolipásica A2 em gema incorporada ao ágar

3.4.1.1. Preparo da solução de gema de ovo

Para avaliar a atividade fosfolipásica A2 foi utilizada a técnica da gema de ovo incorporada ao ágar (HABERMAN & HARDT, 1972). Para preparar o substrato, a gema foi separada da clara e ainda inteira, foi lavada com PBS para retirar o restante da clara. Em seguida, a gema foi perfurada e o conteúdo filtrado em gaze cirúrgica. Preparou-se uma solução a 25% do filtrado em PBS, a qual foi

centrifugada a 2.000 g por 10 minutos (centrifuga Bench Top, Beckman). O sobrenadante obtido foi congelado até o uso.

3.4.1.2. Preparo das placas de ágar contendo gema de ovo incorporada

Para preparar uma placa com a gema incorporada ao ágar, 0,3 g de ágar granulado foram solubilizados em 20 mL de PBS. Esta suspensão foi submetida ao microondas para se obter uma solução homogênea. Após este processo, aguardou-se até que a temperatura da solução de ágar diminuisse para 50 °C e, então, foram adicionados 500 µL de gema de ovo a 25% e 5 µL de CaCl₂ 1 M. Esta solução de ágar foi distribuída em placa de Petri e, após a solidificação, foram feitos 12 furos no ágar com cilindro de metal (diâmetro 0,31 cm) para criar poços distribuídos uniformemente, para aplicação das amostras.

3.4.1.3. Amostras utilizadas no ensaio

Foi preparada uma placa para avaliar a atividade fosfolipásica A2 da peçonha de *M. lemniscatus*, para a obtenção de uma curva de concentração, aplicando-se 12 µL de soluções de 1,25 a 20 µg/mL da peçonha em PBS, por poço. O mesmo foi feito para a peçonha de *C. d. terrificus*, porém, com concentrações de 12,5 a 200 µg/mL, utilizada como controle positivo. Paralelamente, foram preparadas placas para identificar a atividade fosfolipásica A2 nas frações obtidas do fracionamento por exclusão molecular, aplicando-se 12 µL de soluções a 5 µg/mL de cada fração em PBS, por poço. Em todas as placas foram aplicados 12 µL de solução a 50 µg/mL da peçonha de *C. d. terrificus* em PBS, como controle positivo.

3.4.1.4. Condições do ensaio

Após a aplicação das amostras, as placas foram colocadas em câmara úmida e incubadas a 37 °C, por 20 h. Os ensaios foram realizados em duplicata. A atividade fosfolipásica A2 foi evidenciada pela formação de halos transparentes ao redor dos poços e avaliada pela medida destes halos.

3.4.2. Atividade hialuronidásica por zimografia

Para avaliar a presença de possíveis enzimas com atividade sobre o ácido hialurônico, a peçonha de *M. lemniscatus*, bem como as frações obtidas por exclusão molecular (15 µg de cada amostra) foram ressuspensas em tampão de amostra (1,0 mL de Tris-HCl 0,5 M pH 6,8; 0,8 mL de Glicerol; 1,6 mL de SDS 10%; 0,4 mL de água destilada), livre de agente redutor (β -mercaptoetanol), incubadas durante 3 a 5 min em água fervente e, em seguida, submetidas à eletroforese em gel SDS-PAGE 12,5% contendo 2,2 mg de ácido hialurônico, proveniente de cordão umbilical humano (Sigma) incorporado no gel. Hialuronidase de testículo bovino (20 µg; controle positivo, Sigma) e padrões de massa molecular também foram aplicados no gel, conforme item 3.3.1. A corrida foi realizada a 50 V para a primeira hora e a 150 V por cerca de mais uma hora, em fonte para eletroforese EPS 200 (Pharmacia Biotech), a 4 °C. Ao final da corrida o gel foi lavado com triton X100 a 2% para remoção do SDS.

Em seguida, o gel foi incubado com tampão fosfato de sódio 0,2 M pH 6,0, por 2 h, para possibilitar a atividade da enzima sobre o substrato. Posteriormente, o gel foi fixado com solução de ácido tricloroacético 12,5%, a 4 °C, por 30 minutos e lavado com solução de ácido acético 3%, sob agitação, por 1 h. O gel foi tratado com solução de ácido periódico 1% em ácido acético 3%, sob agitação, por 1 h, ao abrigo da luz e, após este procedimento, tratado com solução de metabissulfito de potássio 0,5%, por 30 minutos.

O gel foi corado com solução de Alcian Blue 0,5%, por 4 h, e descorado com solução de ácido acético 7% (GOUVEIA *et al*, 2005). A degradação do ácido hialurônico, visualizada pela formação de halos transparentes na matriz do gel, evidencia a atividade da enzima hialuronidase sobre as amostras.

3.4.3. Atividade hemaglutinante e hemolítica sobre eritrócitos de coelho (2,0%)

3.4.3.1. Obtenção dos eritrócitos de coelho (2,0%)

O sangue de coelho foi coletado e imediatamente misturado com solução anticoagulante de Alsever (glicose 2,05%, NaCl 0,42%, citrato trisódico 0,8%, ácido

cítrico 0,055% em água destilada - Alsever e Ainslie, 1941) na proporção 1:1. Para obtenção das hemácias, uma alíquota de sangue com o anticoagulante foi diluído (1:10 v/v) em solução salina (NaCl 0,15 M) e centrifugada a 3000 g, por 3 min. O sobrenadante foi descartado e as hemácias foram ressuspendidas em salina e novamente centrifugadas (3000 g por 3 min). Este procedimento foi repetido por três vezes ou até obtenção de um sobrenadante incolor. As células lavadas foram ressuspendidas em tampão fosfato com salina (PBS) pH 7,4 de maneira a obter uma suspensão 2,0% v/v.

3.4.3.2. Atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de coelho (2,0%)

Os ensaios de aglutinação foram realizados em placas de microtitulação contendo 96 poços com fundo cônico, o que possibilita a visualização do sedimento das hemácias que não se aglutinam. Os poços foram preenchidos com 50 µl PBS pH 7,4. Em seguida, foram acrescentados de 50 µl da peçonha ou das frações obtidas do fracionamento por exclusão molecular (30 µg), nos primeiros poços das fileiras. As amostras foram, então, diluídas serialmente, com agitação e transferência de 50 µl para o poço seguinte até o penúltimo poço da fila. Terminadas as diluições, foram adicionados 50 µl da suspensão de eritrócitos a 2,0% (v/v). Foi utilizado como controle positivo uma fração aglutinante da peçonha do peixe escorpião, *Scorpaena plumieri*.

3.4.3.3. Teste da susceptibilidade hemolítica de eritrócitos de coelho (2,0%)

Para avaliar a possível ação hemolítica da peçonha, bem como das frações obtidas no fracionamento, por exclusão molecular, utilizaram-se eritrócitos de coelho, segundo a metodologia descrita por Habermann e colaboradores (1981). Uma alíquota de 100 µL da suspensão de eritrócitos de coelho a 2,0% v/v foi incubada com concentrações crescentes da peçonha (0,1 µg/mL; 1,0 µg/mL; 5,0 µg/mL, 10,0 µg/mL e 50,0 µg/mL) e com as frações (5,0 µg/mL), durante 30 min, a 37 °C. Em seguida, as misturas foram centrifugadas a 14.000 g (1 min; 25 °C) e a hemoglobina liberada foi detectada por medida da densidade óptica do sobrenadante, a 540 nm. A porcentagem de hemólise foi determinada em relação à

hemólise total 100% (controle positivo), obtida por incubação dos eritrócitos em água. Os ensaios foram realizados em triplicata.

3.4.4. Ação da peçonha de *M. lemniscatus* e de suas frações sobre as células MACL-1 (adenocarcinoma de mama)

As células MACL-1 (linhagem primária de câncer de mama), estabelecidas por Correa e colaboradores (2009) foram mantidas em meio de cultura DMEM (Sigma) suplementado com 10% de soro fetal bovino (Gibco) em frascos de cultura T-75 (TPP®) em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C.

As células MACL-1 foram incubadas a 37 °C com tripsina (Gibco) por aproximadamente 5 minutos ou até que estivessem soltas dos frascos. Posteriormente, inativou-se a tripsina com DMEM + 10% SFB. A suspensão de células foi transferida para um tubo Falcon® estéril, centrifugada a 800 rpm por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e o pellet ressuspendido em 1 mL de meio de cultura DMEM. Após a contagem em câmara de Neubauer, as células foram plaqueadas em triplicatas em placas de 96 poços (TPP) numa densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço e expostas a diferentes concentrações (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL, 0,39 µg/mL, 0,19 µg/mL e 0,01 µg/mL) da peçonha e de suas respectivas frações obtidas por exclusão molecular. Foi utilizado EDTA 10 mM como controle positivo. As placas foram mantidas em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37 °C por 24 h.

Após este período, o meio de cultura contido em cada poço foi descartado, as células foram lavadas com PBS (1x) e fixadas com solução de paraformaldeído 4% em PBS por 1 hora, à temperatura ambiente. Depois de lavadas três vezes com PBS, as células foram permeabilizadas com Triton-X 100 0,1% por 10 minutos à temperatura ambiente e novamente lavadas com PBS, por 3 vezes. As células foram incubadas com Faloidina conjugada a Alexa Fluor 488 (Invitrogen) de acordo com o protocolo proposto pelo fabricante e DAPI (Sigma) 300 nM por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as placas foram lavadas 2 vezes com PBS (1x), mantidas protegidas da luz e analisadas por meio de microscopia de fluorescência (Zeiss Axiovert 200M), usando-se os programas Carl Zeiss AxioVision Rel. 4.8 Software®.

3.4.5. Atividade antimicrobiana da peçonha de *M. lemniscatus* e de suas frações

3.4.5.1. Cepas microbianas utilizadas.

Para avaliar a atividade antimicrobiana da peçonha e das frações de *M. lemniscatus*, obtidas por exclusão molecular, foram utilizadas quatro cepas bacterianas de referência: *Escherichia coli* (ATCC® 25922™), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC® 27853™), *Enterococcus faecalis* (ATCC® 29212™) e *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™). As cepas foram cedidas pelo Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (Fundação Ezequiel Dias) e armazenadas a -80 °C.

3.4.5.2. Crescimento e padronização das cepas bacterianas

Para padronizar a densidade dos inóculos bacterianos para os testes de sensibilidade, determinou-se utilizar o padrão 0,5 da escala McFarland. As cepas bacterianas foram repicadas em ágar sangue e incubadas por 24 h, em estufa (Revco) com 5% de CO₂, 37°C. Para o preparo de cada inóculo, foram selecionadas de 3 a 4 colônias isoladas, com aspectos morfológicos semelhantes. Estas foram inoculadas em tubos de ensaio contendo 10mL de solução de NaCl 0,9% (m/v) e a turbidez óptica determinada por comparação com a escala de 0,5 McFarland, que corresponde a, aproximadamente, $1,5 \times 10^8$ UFC/mL. Em seguida, os inóculos foram diluídos para uma concentração final de $1,0 \times 10^5$ UFC/mL para serem utilizados nos testes antimicrobianos.

3.4.5.3. Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM) da peçonha e das frações obtidas do fracionamento por exclusão molecular.

Para avaliar a atividade antimicrobiana, as amostras foram submetidas a testes de concentração inibitória mínima (CIM). Os testes foram realizados em microplacas de polipropileno de 96 poços, com fundo em “U”, esterilizadas (Sigma Aldrich).

As frações obtidas do fracionamento por exclusão molecular foram diluídas serialmente (500 µg/mL a 0,25 µg/mL) em Caldo Mueller Hinton II (Fluka), na própria microplaca, resultando, em cada poço, um volume de 90µL. Em seguida, foram inoculados 10 µL das suspensões bacterianas das quatro cepas bacterianas de referência na concentração de 10⁵ UFC/poço, resultando em um volume final de 100 µL/poço. Como controle positivo, para avaliar a viabilidade das bactérias testadas, foram inoculados 10 µL das suspensões bacterianas em 90 µL de Caldo Mueller Hinton II. Além disso, o antibiótico comercial Gentamicina (Sigma) foi utilizado como controle positivo na concentração de 0,1 µg/mL. Como controle negativo, utilizaram-se 100µL do Caldo Mueller Hinton II.

As microplacas foram incubadas por 24 h, em estufa contendo 5% de CO₂ e a 37°C. Após a incubação foram feitas leituras visuais das placas, observando-se a ausência ou formação de turbidez nos poços indicando, respectivamente, inibição e crescimento bacteriano. Em seguida, foram feitas leituras da absorbância a 620 nm em leitor de placa (Anthos) para confirmar os resultados visuais.

Para avaliar se o efeito inibitório observado foi bactericida ou bacteriostático, determinou-se a concentração bactericida mínima (CBM). Alíquotas de 10 µL de cada poço referente à concentração inibitória mínima e dos poços referentes à duas concentrações acima foram inoculados em placas com ágar sangue e incubados por 24 h em estufa contendo 5% de CO₂, a 37°C. Após a incubação, observou-se a ausência ou formação de colônias bacterianas.

3.5. Processo de purificação do componente antimicrobiano de *M. lemniscatus* (MI-AM)

3.5.1. Segunda etapa de purificação: Cromatografia de troca aniônica

A fração com maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC[®] 6538[™]) resultante do fracionamento por exclusão molecular (item 3.2) foi submetida à cromatografia líquida de troca aniônica em sistema de HPLC no equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare), controlado pelo software UNICORN 5.11.

A amostra liofilizada (cerca de 0,4 mg) foi ressuspensa em 2,0 mL de tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,0, centrifugada a 10.000 g por 10 min à 4 °C para retirada de partículas sólidas e o sobrenadante límpido foi aplicado em coluna

de troca aniônica SynChropack AX 300 (250 x 4,6 mm), equilibrada com o mesmo tampão. A amostra foi eluída à temperatura ambiente com tampão fosfato de sódio (0,01M) (Eluente A) e o mesmo tampão contendo 1,0 M NaCl pH 7,0 (Eluente B) em um gradiente constituído de cinco etapas lineares (0% B em 10 min; 0 - 20% B em 10 min ; 20 - 40% B em 5 min ; 40 -100% B em 10 min ; 100% B em 15 min). A eluição dos componentes da amostra foi realizada em um fluxo de 1,0 mL/min. A corrida foi monitorada na absorvância de 280 nm e as frações foram coletadas manualmente. Após análise do perfil cromatográfico, o conteúdo dos tubos correspondentes à cada fração foram reunidos e estas foram submetidas ao processo de diálise, em membrana de corte de 12 - 14.000 Da (Spectra/Por®). As frações foram liofilizadas e armazenadas a -80 °C até serem utilizadas.

O cálculo de recuperação proteica foi feito a partir dos valores de absorvância a 280 nm (conforme ítem 3.11), considerando-se que cada unidade de absorvância é equivalente a 1,0 mg de proteína.

As frações obtidas foram submetidas à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (conforme ítem 3.3.1) e à análise por espectrometria de massas MALDI-TOF (conforme ítem 3.3.2) para avaliar o perfil proteico e identificar as massas moleculares.

3.5.2. Terceira etapa de purificação: Cromatografia de fase reversa analítica

A fração com maior atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (ATCC® 6538™) obtida na etapa anterior (ítem 3.5.1) foi submetida à cromatografia líquida de fase reversa em sistema de HPLC, no equipamento ÄKTA Purifier (GE Healthcare) controlado pelo software UNICORN 5.11.

A amostra liofilizada (cerca de 0,1 mg) foi centrifugada a 10.000 g por 10 min, à 4 °C para retirada de partículas sólidas e aplicada em coluna de fase reversa analítica Vydac C4 (250 x 4,6 mm), previamente equilibrada com solução A (0,1% de TFA em H₂O milli-Q®). A amostra foi eluída à temperatura ambiente com solução B (0,1% de TFA em ACN) em um gradiente constituído de três etapas lineares (0% B em 10 min; 0 - 70% B em 70 min; 70% B em 10 min). A eluição dos componentes da amostra foi realizada em um fluxo de 1,0 mL/min. A corrida foi monitorada na

absorbância de 280 nm e as frações foram coletadas manualmente.

Os picos proteicos foram submetidos à eletroforese unidimensional em gel de poliacrilamida (conforme item 3.3.1) e à análise por espectrometria de massas MALDI-TOF (conforme item 3.3.2) para avaliar o perfil proteico e identificar as massas moleculares.

3.6. Atividade antimicrobiana

3.6.1. Cepas microbianas utilizadas

Para avaliar a atividade antimicrobiana das frações obtidas no processo de purificação foi utilizada somente a cepa bacteriana de referência *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™). As cepas foram cedidas pelo Serviço de Doenças Bacterianas e Fúngicas da Diretoria do Instituto Octávio Magalhães (Fundação Ezequiel Dias) e armazenadas a -80 °C.

3.6.2. Crescimento e padronização das cepas bacterianas

A padronização da densidade dos inóculos bacterianos foi realizada Conforme item 3.4.5.2.

3.6.3. Ensaios de Concentração Inibitória Mínima (CIM) e Concentração Bactericida Mínima (CBM).

A atividade antimicrobiana das amostras obtidas após cada etapa do processo de purificação do MI-AM foi avaliada para determinação da CIM e também da CBM, conforme item 3.4.5.3. As amostras foram diluídas serialmente, nas concentrações de 100 µg/mL a 0,02 µg/mL.

3.7. Ensaios de Viabilidade/Toxicidade celular

3.7.1. Linhagens celulares e manutenção das culturas

As linhagens comerciais THLE-2 (células hepáticas humanas) (ATCC® CRL-2706™), WI26-VA4 (fibroblastos humanos) (ATCC® CCL 95.1™), e HEK-293 (células renais humanas) (ATCC® CRL 1573™) foram mantidas em meio de cultura BEGM Bullet Kit (Lonza/Clonetics Corporation). A primeira linhagem (THLE-2) foi mantida em meio EMEM (Eagle's Minimum Essential Medium - SIGMA) suplementado com soro fetal bovino a 10%. As outras duas linhagens (WI26-VA4; HEK-293) foram mantidas em frascos de cultura T-25 (TPP), em estufa úmida, contendo 5% de CO₂ a 37 °C. As culturas celulares foram expandidas para frascos de cultura T-75 (TPP) por meio de repiques semanais, por tripsinização, de acordo com a confluência celular, e o meio de cultura foi substituído a cada 2 ou 3 dias, mediante a alteração no pH, identificado pela mudança na coloração.

3.7.2. Ensaios de citotoxicidade.

As linhagens celulares THLE-2, WI26-VA4, e HEK-293 foram adicionadas em placas de 96 poços na densidade de 1×10^4 células/poço e foram incubadas em estufa úmida contendo 5% de CO₂ a 37 °C, por 24 horas. Após esse período as células foram expostas a diferentes concentrações da peçonha e de MI-AM (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL, 0,39 µg/mL, 0,19 µg/mL e 0,01 µg/mL), por 24 horas e recolocadas imediatamente em estufa úmida, contendo 5% de CO₂, a 37°C. Os ensaios de citotoxicidade (metabolização de MTT e microscopia de fluorescência) foram realizados após esse período.

3.7.3. Avaliação de viabilidade celular.

O ensaio de metabolização de MTT é um método colorimétrico sensível e quantitativo que mensura a viabilidade, proliferação e estado de ativação das células (MOSMANN, 1983). Esse ensaio é baseado na capacidade de enzimas desidrogenases, presentes na mitocôndria de células viáveis, de converter o

substrato MTT, solúvel em água, em cristais de formazan, produto insolúvel em água. Uma vez que a quantidade de formazan produzida é diretamente proporcional ao número de células viáveis, esse modelo foi usado com o objetivo de avaliar citotoxicidade induzida por diferentes concentrações das frações do veneno de *M. lemniscatus*. As células cultivadas em placas de 96 poços, que foram submetidas a diferentes concentrações das frações do veneno, tiveram o meio de cultura das placas removido e foram adicionados 100 µL de solução de MTT (5 mg/mL) diluído em meio incompleto, em cada poço. As amostras foram mantidas na estufa por três horas para metabolização do MTT. Após esse período, foram adicionados 100 µL de dimetilsulfóxido (DMSO, Sigma) e fez-se a leitura dessas placas, a uma absorvância de 595 nm, em leitor automático de microplacas (Anthos). Os valores de densidade óptica dos grupos controle foram considerados como 100% para cálculo da porcentagem de alteração da viabilidade celular induzida pela exposição às frações.

3.7.4. Avaliação da viabilidade das linhagens celulares por microscopia de fluorescência

A avaliação da citotoxicidade através de microscopia de fluorescência foi baseada na determinação simultânea de células vivas e mortas utilizando de duas sondas (calceína AM e homodímero de etídio - EthD-1) com coloração diferente onde os parâmetros de medida de reconhecimento da viabilidade celular é a atividade de esterase e a integridade da membrana plasmática.

Para determinar qualitativamente, as células vivas e mortas, estas foram plaqueadas numa densidade de $1,0 \times 10^4$ células/poço em placas de 96 poços, expostas à diferentes concentrações da peçonha e de MI-AM (50 µg/mL, 25 µg/mL, 12,5 µg/mL, 6,25 µg/mL, 3,12 µg/mL, 1,56 µg/mL, 0,78 µg/mL, 0,39 µg/mL, 0,19 µg/mL e 0,01 µg/mL), bem como ao peróxido de hidrogênio (2,0 mM) (controle de morte) e incubadas em estufa úmida contendo 5% de CO₂, à 37 °C por 24 h. Após esse período o meio foi removido e as células lavadas 1 vez com PBS para remover possíveis resíduos. Em seguida as células foram marcadas com o Kit para determinação de viabilidade e citotoxicidade Live/Dead® (Molecular Probes – Invitrogen) seguindo-se o protocolo proposto pelo fabricante e observadas por microscopia de fluorescência.

3.8. Ação da MI-AM sobre lipossomos L- α -fosfatidilcolina

Vesículas unilamelares de lipossomos foram preparadas de acordo com Frezard (1994). L- α -fosfatidilcolina foi dissolvida em clorofórmio e secada sob fluxo de argônio. O filme lipídico formado foi totalmente secado à vácuo, a 55 °C, por 45 min e, em seguida, hidratado com 1,0 mL de solução tampão (HEPES a 0,02 mol/L, NaCl a 0,15 mol/L, calceína a 0,075 mol/L pH 7,2) para os experimentos de liberação de fluorescência, medida por espectroscopia. A suspensão foi sonicada (Sonics – Vibracell) sob fluxo de argônio, em banho de água e gelo, até que a turbidez da mesma desaparecesse, indicando a formação de vesículas unilamelares. A calceína não encapsulada no processo foi removida por cromatografia em coluna de Sephadex G-50 (1 mL de volume), equilibrada com o tampão de incubação (HEPES a 0,02 mol/L, NaCl a 0,15 mol/L pH 7,2).

A avaliação da atividade de permeabilização da membrana, na presença de 50 μ g MI-AM, foi detectada pela liberação de calceína, após 6 minutos de incubação, à 37 °C. Esta liberação foi monitorada em espectrofluorímetro (Cari Eclipse – Varian) utilizando-se o comprimento de onda de 505 nm para excitação e de 513 nm para a emissão. A fluorescência máxima emitida (100% de liberação de calceína) foi determinada adicionando-se 10 μ L de solução de Triton X-100 (10% em volume) à amostra (2,5 mL). A fluorescência foi monitorada durante todo o experimento.

3.9. Ensaio de *cross-linking*

Para avaliação da natureza oligomérica da MI-AM foi utilizado o ensaio de *cross-linking*, empregando-se o suberato bis-[sulfosuccinimidil] (BS₃ Pierce) como *cross-linker*. MI-AM (5,6 mg/mL, em PBS) foi incubado na ausência de BS₃, assim como em concentrações crescentes do cross-linker (1,0 mM, 2,0 mM, 5,0 mM e 10,0 mM) por 1 hora, a 26 °C, na ausência de luz. Após a incubação, as amostras foram analisadas por SDS-PAGE 7,5% de acordo com o item 3.3.1. As massas moleculares utilizadas como padrão foram (em kDa) 250, 150, 100, 80, 60, 50, 40, 30, 25, 20, 15 e 10 (BioLabs).

3.10. Análise de MI-AM por espectrometria de massas (MALDI- TOF-TOF)

3.10.1. Remoção da coloração dos “spots”: Redução e Alquilação

As bandas proteicas da eletroforese em gel, referentes à fração EM-F1, (cromatografia de exclusão molecular), à MI-AM (cromatografia de troca aniônica), e à MI-AM (cromatografia em fase reversa analítica), foram removidas dos géis, cortadas em pedaços de cerca de 1 mm e, posteriormente descoradas com 0,2 mL de acetonitrila 50% (v/v) em H₂O milli-Q®. Esta solução foi trocada a cada 15 minutos, até a remoção total do corante. O processo foi realizado à temperatura ambiente. Após a remoção da coloração, as mesmas foram desidratadas com 0,2 mL de acetonitrila (PA). Em seguida, a acetonitrila foi removida das amostras por concentração à vácuo (SpeedVac, Thermo Scientific). Posteriormente, as proteínas contidas nas bandas foram reduzidas com 0,1 mL de 5 mM Tris-2-carboxietil-fosfina (TCEP) em solução de bicarbonato de amônio 100 mM, incubados por 30 minutos em temperatura ambiente. Passado esse período, a solução redutora foi removida e foram adicionou-se 0,1 mL da solução alquilante às bandas, contendo 10 mM de iodoacetamida em bicarbonato de amônio 100 mM, pelo mesmo período de incubação da solução redutora. Para a remoção do excesso da solução de alquilação os fragmentos foram lavados com a solução de bicarbonato de amônio 100 mM e desidratados com acetonitrila PA. Este processo foi repetido por mais 2 vezes e, no final, a acetonitrila PA foi evaporada em SpeedVac.

3.10.2. Digestão e extração das proteínas.

Os fragmentos de géis foram rehidratados com uma solução de bicarbonato de amônio 40 mM em 9% de acetonitrila, contendo tripsina (20 µg/mL preparada de acordo com o fabricante/ Sigma). O processo de rehidratação ocorreu em banho de gelo por 30 minutos e, após esse período, foram adicionados 0,05 mL ou quantidade suficiente de solução de bicarbonato de amônio 50 mM para que todos os fragmentos ficassem imersos na solução. Os tubos foram incubados a 37 °C, overnight.

A reação foi parada pela adição de 0,030 mL de solução de TFA (0,1% em H₂O) ao meio e incubação por 10 min. Em seguida, as amostras foram centrifugadas

a 14000 g, por 20 min e o sobrenadante foi reservado. A extração dos fragmentos de peptídeos procedeu-se pela adição de 0,015 mL de solução de TFA (0,1% em H₂O) ao tubo contendo os pedaços de gel. Posteriormente, estes foram incubados por 10 minutos à temperatura ambiente, centrifugados a 14000 g, por 20 min e o sobrenadante reservado em novo tubo.

Os “pellets” foram submetidos a duas outras etapas de extração:

- 1ª etapa: adição de 0,015mL de solução TFA (0,1% em ACN 50%) e incubação por 10 min, à temperatura ambiente, e centrifugados a 14000 g, por 10 min. Posteriormente, o sobrenadante foi coletado e adicionado ao tubo, juntamente com o sobrenadante reservado na etapa anterior;
- 2ª etapa: adição de 0,015mL de solução (TFA 0,1% em ACN 70%) e incubação por 10 min, à temperatura ambiente, e centrifugados a 14000 g, por 10 min. O sobrenadante foi coletado e adicionado ao tubo já contendo o sobrenadante previamente coletado na outras etapas. Essa solução foi evaporada em SpeedVac até atingir o volume aproximado de 0,01mL.

Após a extração dos fragmentos de peptídeos, os mesmos foram dessalinizados em micro coluna Zip-Tip (resina C₁₈ P10, Milipore) e em seguida, submetidas à espectrometria de massas do tipo MALDI TOF-TOF.

3.10.3. MALDI TOF-TOF MS/MS

As amostras foram preparadas para análise de MALDI-TOF-TOF (Matrix Assisted Laser Desorption ionized Time of Flight- Time of Flight) em um aparelho Autoflex III TM, software FlexControlTM e FlexAnalysisTM (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA).

Alíquotas de 0,5 µL de cada solução dos fragmentos dessalinizados foram aplicadas em placa anchorship 600 (Bruker Daltonics, Bilerica, EUA) e em seguida co-cristalizadas com 0,5 µL de solução saturada da matrix composta por ácido α-cyano-4-hidroxicinâmico (5 mg/mL de CHCA em acetonitrila 70% / TFA 0,1%) à temperatura ambiente. O espectrômetro foi operado em modo refletido para obtenção das massas dos fragmentos gerados pela digestão com tripsina, e em modo *Lift* para obtenção de íons para sequenciamento *de novo*.

A calibração externa do modo MS foi realizada utilizando-se a mistura de peptídeos “Peptide Calibration Standard II” (bradicinina m/z = 757,39; angiotensina II

m/z = 1046,54; angiotensina I m/z = 1296,68; substância P m/z = 1347,73; bombesina m/z = 1619,82; substrato da renina m/z = 1758,93; ACTH (1-17) m/z = 2093,08; ACTH (18-39) m/z = 2465,19; e somatostatina (28) m/z = 3147,47) da Bruker Daltonics, Bilerica (EUA). Os sinais dos íons mais intensos foram selecionados automaticamente, como precursores para aquisição do MS/MS. Os espectros foram posteriormente analisados pelos softwares FlexAnalysis 3.3 e Biotoools 3.2 (Bruker Daltonics) e a busca por similaridade foi feita utilizando-se a ferramenta Mascot. Como banco de dados foi utilizado o SwissProt.

3.11. Estimativa proteica

O conteúdo proteico da peçonha, bem como das frações obtidas pelo fracionamento por exclusão molecular e das frações obtidas nas etapas de purificação de MI-LAAO, foi estimado por espectrofotometria, pelo equipamento NanoVue™ Plus (GE Healthcare), no comprimento de onda de 280 nm.

3.12. Análises estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm erro padrão da média (EPM). Quando necessário, os dados foram avaliados usando-se análise de simples variância (ANOVA) ou teste *t* de Student não pareado. O valor de $p < 0,05$ foi usado para indicar diferença significativa entre os grupos.

4. RESULTADOS

4.1. Fracionamento da peçonha da serpente *M. lemniscatus*

A primeira etapa do fracionamento da peçonha de *M. lemniscatus* consistiu de uma cromatografia de exclusão molecular, em sistema HPLC. Esse processo separou a peçonha em onze frações (EM-F1 a EM-F11, EM de exclusão molecular) e o perfil cromatográfico está mostrado na figura 8. A recuperação proteica calculada a partir da absorbância a 280 nm foi de aproximadamente 64%, sendo considerado que uma unidade de absorbância equivale a 1,0 mg de proteína (tabela 3).

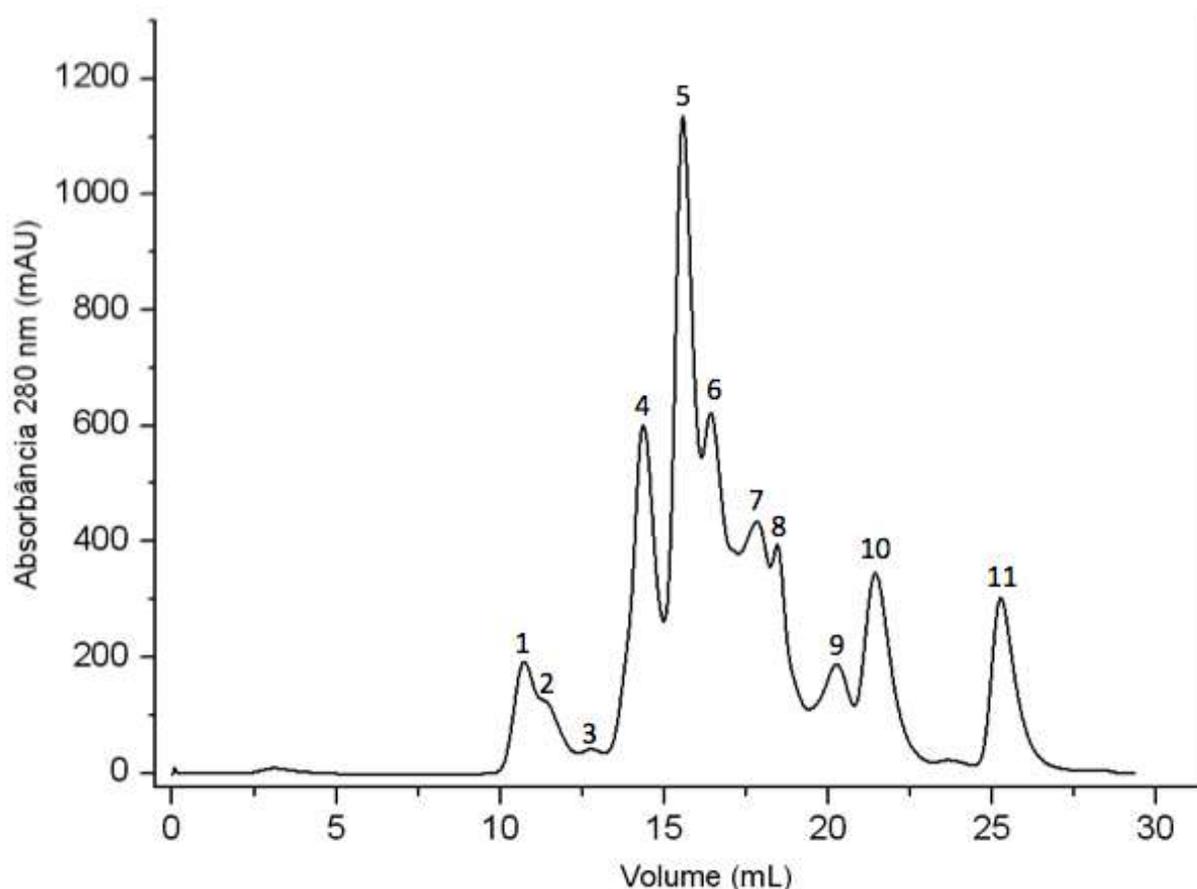


Figura 8: Perfil cromatográfico do fracionamento por exclusão molecular da peçonha de *M. lemniscatus*. A peçonha (6mg) foi solubilizada no tampão de corrida bicarbonato de amônio (0,05 M) pH 7,8 e submetida à cromatografia de exclusão molecular em coluna Superose 12 HR 10/30 utilizando-se o mesmo tampão. As amostras foram eluídas em fluxo de 0,5 mL/min. As frações estão numeradas sequencialmente e indicadas como: EM-F1 (1), EM-F2 (2), EM-F3 (3), EM-F4 (4), EM-F5 (5), EM-F6 (6), EM-F7 (7), EM-F8 (8), EM-F9 (9), EM-F10 (10) e EM-F11 (11). EM = exclusão molecular.

Tabela 3: Recuperação proteica das frações obtidas do fracionamento da peçonha de *M. lemniscatus*, por exclusão molecular

Frações de <i>M. lemniscatus</i>	Unidade totais de A_{280nm} (mg)	Recuperação proteica (%) **
Peçonha	6,000*	100,00*
EM-F1	0,150	2,50
EM-F2	0,105	1,75
EM-F3	0,135	2,25
EM-F4	0,495	8,25
EM-F5	0,880	14,67
EM-F6	0,575	9,58
EM-F7	0,386	6,43
EM-F8	0,400	6,67
EM-F9	0,160	2,67
EM-F10	0,376	6,27
EM-F11	0,172	2,87
Total	3,834	63,9%

* 6 mg de peçonha de *M. lemniscatus* equivale a 100% de recuperação proteica.

** Recuperação proteica estimada a partir da somatória das leituras da absorbância a 280 nm, de cada fração.

4.2. Caracterização Química das frações obtidas pelo fracionamento da peçonha de *M. lemniscatus*

4.2.2. Perfil eletroforético em SDS-PAGE 12,5%

Os perfis eletroforéticos, em condições não redutoras, da peçonha, bem como das frações obtidas por cromatografia de exclusão molecular, estão mostrados na figura 9. Observa-se que a peçonha é constituída de moléculas de massas moleculares na faixa de 50 a 70 kDa, entretanto a maioria dos componentes possui massas moleculares abaixo de 20 kDa, confirmando resultados da literatura. Essas massas moleculares aparentes, foram estimadas pela curva padrão, apresentada na figura 10.

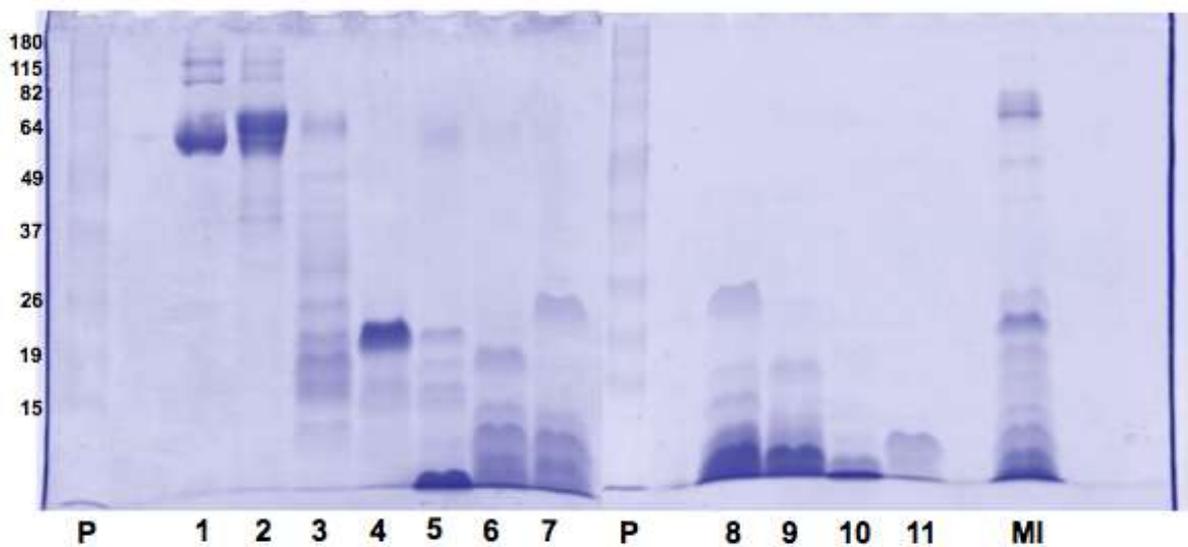


Figura 9: Perfis eletroforéticos em SDS-PAGE (12,5%) da peçonha e das frações de *M. lemniscatus* obtidas por cromatografia de exclusão molecular. Foram aplicados 15 µg de cada amostra, ressuspensos em tampão de amostra, sem agente redutor β-mercaptoetanol. P (padrão de massa molecular); 1 (EM-F1); 2 (EM-F2); 3 (EM-F3), 4 (EM-F4), 5 (EM-F5); 6 (EM-F6); 7 (EM-F7); 8 (EM-F8); 9 (EM-F9); 10 (EM-F10); 11 (EM-F11); MI (peçonha).

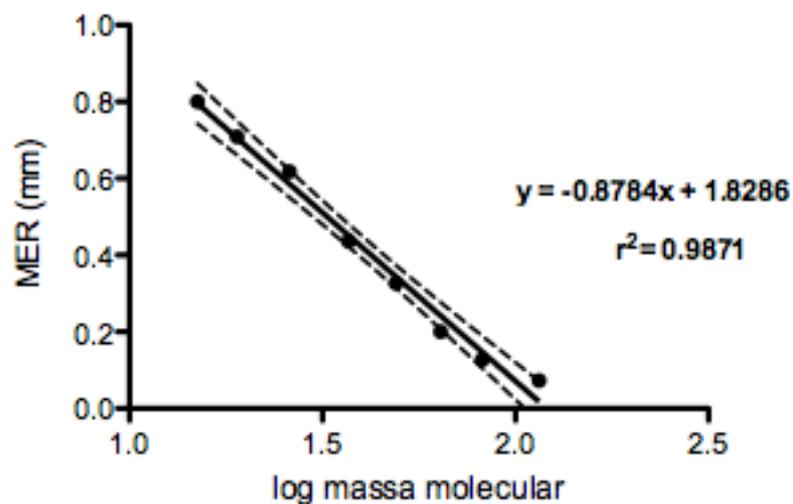


Figura 10: Curva padrão para estimativa de massas moleculares. Gráfico plotado a partir dos logaritmos das massas moleculares dos padrões, em função da razão das suas mobilidades eletroforéticas relativas (MER).

4.3. Análise por espectrometria de massas das frações obtidas de fracionamento por exclusão molecular

4.3.1. Distribuição de massas (m/z) das frações

As frações (EM-F1 a EM-F11) foram submetidas à espectrometria de massas utilizando-se a técnica de MALDI-TOF e as massas detectadas estão mostradas na figura 11. As frações EM-F1 e EM-F2 apresentaram sinais mais intensos na faixa de 31 kDa a 138 kDa, enquanto outras apresentaram sinais mais intensos na faixa de 6 kDa a 27 kDa. Entretanto, foram observadas ainda massas na faixa de 30 a 40 kDa.

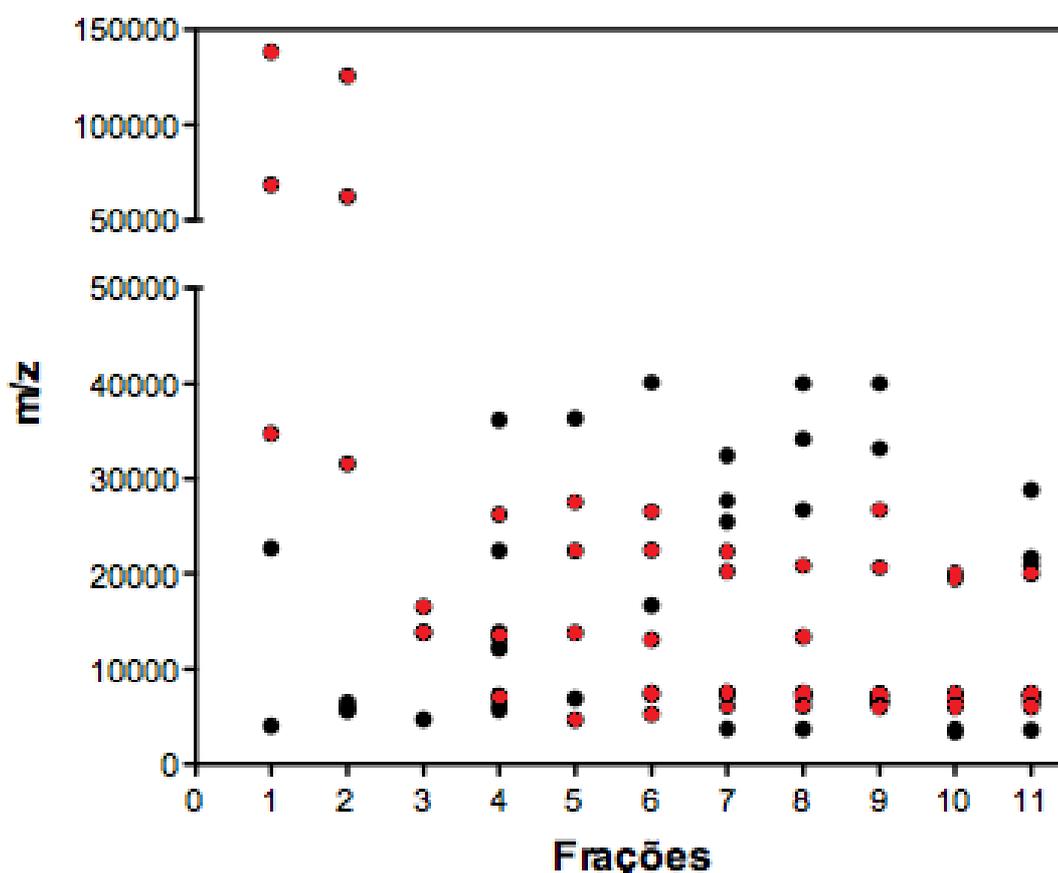


Figura 11: Histograma da distribuição de massas moleculares das frações. O histograma apresenta as massas (m/z) das frações EM-F1 a EM-F11 (representadas no eixo X de 1 a 11) obtidas de fracionamento por exclusão molecular. As massas mais intensas estão representadas por pontos vermelhos.

4.4. Caracterização de diferentes atividades da peçonha e das frações obtidas pelo fracionamento.

A peçonha, e as frações obtidas de fracionamento por exclusão molecular, foram avaliadas quanto à atividades fosfolipásica A2, hialuronidásica, hemaglutinante, hemolítica, ação sobre células em cultura e antimicrobiana.

4.4.1. Atividade fosfolipásica A2

A atividade fosfolipásica A2 foi realizada utilizando-se como substrato a gema de ovo (HABERMAN & HARDT, 1972). A figura 12 mostra as curvas-padrão das peçonhas de *M. lemniscatus* (1,25 a 20 µg/mL) e *C. d. terrificus* (12,5 a 200 µg/mL), esta utilizada como controle positivo e já estabelecida previamente. Como pode ser observado na mesma figura, foram necessários 2,5 µg/mL e 100,0 µg/mL das peçonhas de *M. lemniscatus* e *C. d. terrificus*, para formar halos de atividade de 11,75 mm e 11,53 mm, respectivamente. Os dados são apresentados na **tabela 4**.

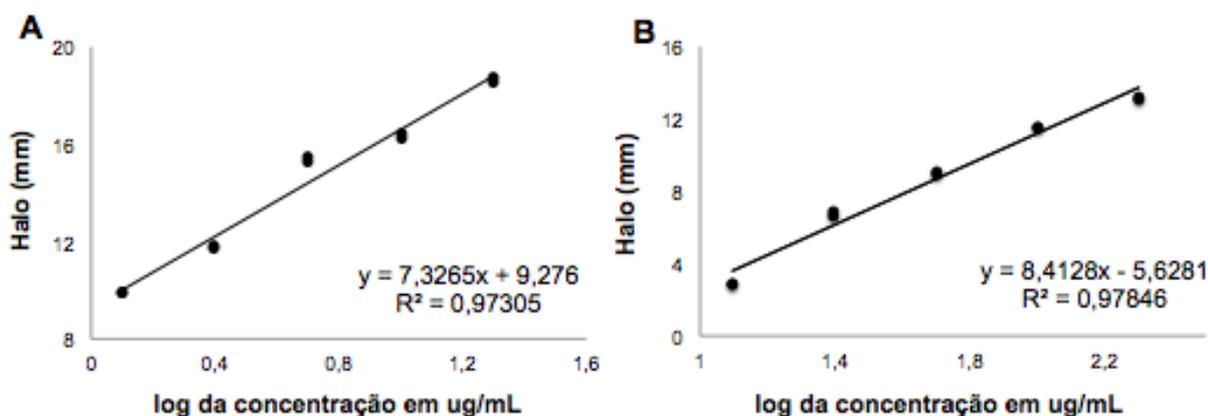


Figura 12: Curvas padrão de atividade fosfolipásica A2 das peçonhas de *M. lemniscatus* e *C. d. terrificus*. Curvas plotadas a partir dos logaritmos das concentrações (µg/mL) das peçonhas em função da medida dos halos de atividade. (A) Curva padrão da peçonha de *M. lemniscatus* (1,25 a 20,0 µg/mL); (B) curva padrão da peçonha de *C. d. terrificus* (12,5 a 200,0 µg/mL). As atividades foram determinadas em função do tamanho do halo medido em uma placa de ágar, contendo suspensão de gema de ovo como substrato (vide “Material e Métodos”, item 3.4.1).

Tabela 4: Atividade fosfolipásica A2 das peçonhas de *M. lemniscatus* e *C. d. terrificus*, em diferentes concentrações.

Peçonha <i>M. lemniscatus</i> (ug/mL)	Halo (mm)	Peçonha <i>C. d. terrificus</i> (ug/mL)	Halo (mm)
20,0	18,65	200,0	13,16
10,0	16,3	100,0	11,53
5,0	15,39	50,0	9,00
2,5	11,75	25,0	6,73
1,25	9,89	12,5	2,90

O substrato utilizado foi uma suspensão de gema de ovo (HABERMAN & HARDT, 1972), conforme descrito em “Material e Métodos, ítem 3.4.1. Os dados foram retirados da figura 12.

A figura 13 mostra que a atividade fosfolipásica A2 da peçonha de *M. lemniscatus*, indicada pela formação de halos transparentes no ágar, está associada às frações EM-F3 a EM-F10, sendo que EM-F4, EM-F5 e EM-F6 mostraram maior atividade. As frações foram avaliadas na concentração de 5 µg/mL, ponto intermediário determinado pela curva de concentração da peçonha de *M. lemniscatus* (tabela 4).

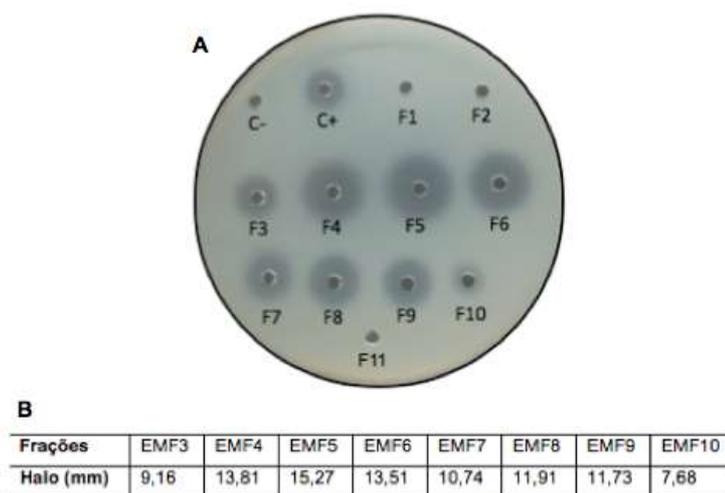


Figura 13: Ensaio da atividade fosfolipásica A2 da peçonha e das frações obtidas pelo fracionamento por exclusão molecular. (A) Foram aplicados 12 µL de soluções a 5 µg/mL das frações obtidas do fracionamento por exclusão molecular em PBS. Controle positivo (C+): 12 µL de solução a 50µg/mL da peçonha de *C. d. terrificus*; controle negativo (C-): 12 µL de solução de PBS; (B) tabela com os valores de medição de halos de atividade fosfolipásica A2 das frações EM-F3 a EM-F10.

4.4.2. Atividade hialuronidásica

A atividade hialuronidásica da peçonha e das frações foi avaliada por zimografia, utilizando-se ácido hialurônico de testículo bovino, como substrato. Esta atividade foi detectada na peçonha e nas frações EM-F1 e EM-F2 (figura 14). Como pode ser observado na figura, tanto a peçonha quanto as frações degradaram o substrato, como mostrado pelos halos transparentes.

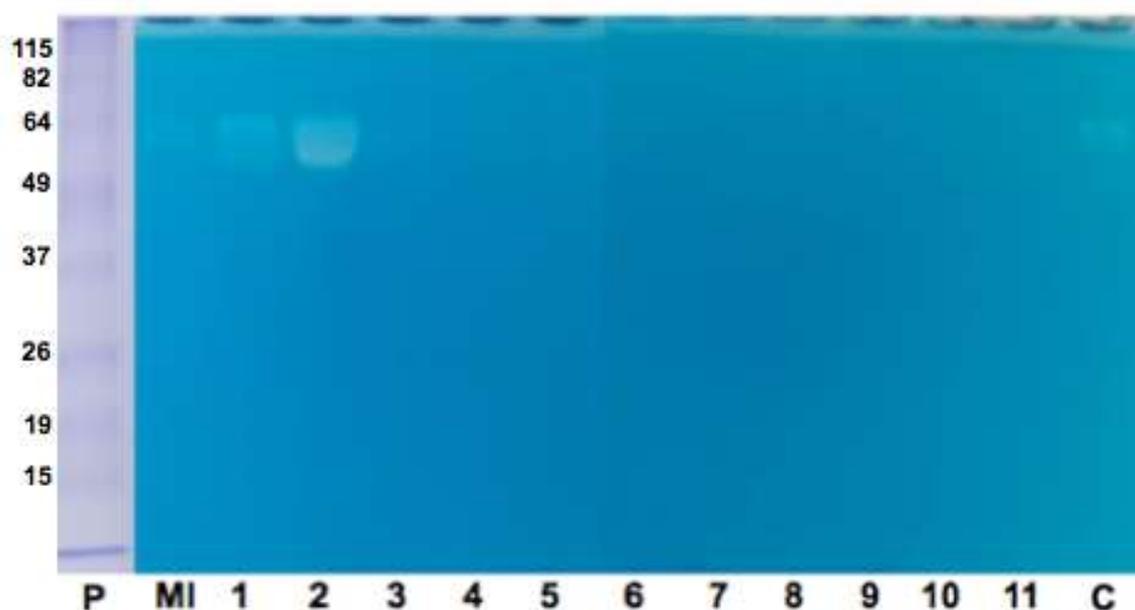


Figura 14: Zimografia mostrando a atividade hialuronidásica da peçonha e de algumas frações de *M. lemniscatus*, obtidas pelo fracionamento por exclusão molecular. Foram aplicados 15 µg de cada amostra. P (padrão de massa molecular); MI (peçonha bruta); 1 (EM-F1); 2 (EM-F2); 3 (EM-F3), 4 (EM-F4), 5 (EM-F5); 6 (EM-F6); 7 (EM-F7); 8 (EM-F8); 9 (EM-F9); 10 (EM-F10); 11 (EM-F11); C (20 µg de hialuronidase de testículo bovino, Sigma).

4.4.3. Atividade hemaglutinante

A figura 15 mostra o resultado da atividade hemaglutinante da peçonha e das frações obtidas por fracionamento por exclusão molecular, sobre eritrócitos de coelho (2,0%). Nas condições do ensaio, 7,5 µg da peçonha e da fração EM-F7 3,75 µg da fração EM-F6, induziram aglutinação dos eritrócitos. As outras frações não apresentaram atividade hemaglutinante (dados não mostrados). Como controle positivo foi utilizado o veneno do peixe escorpião *Scorpaena plumieri* (promovendo

aglutinação até 1,88 µg). Dentre as frações com atividade, EM-F6 foi 2 vezes mais potente que EM-F7 para esta atividade.

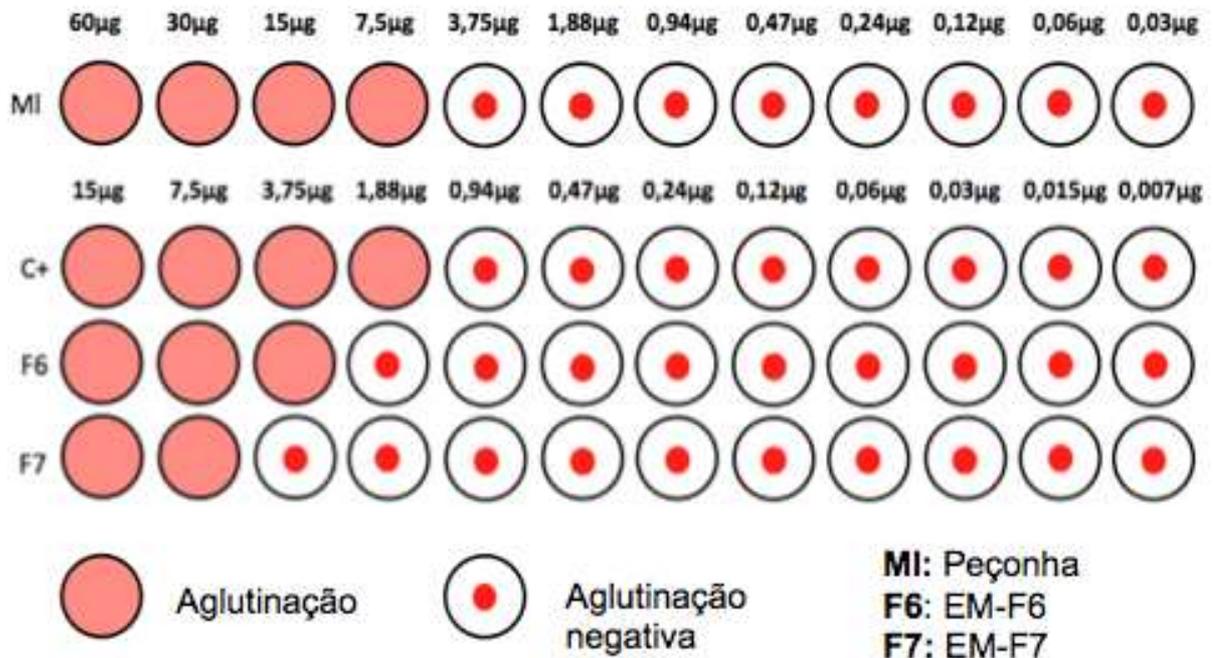


Figura 15: Atividade hemaglutinante sobre eritrócitos de coelho (2,0%) da peçonha de *M. lemniscatus* e de suas frações EM-F6 e EM-F7. (A) Quantidade em µg de cada amostra para promover aglutinação: EM-F6 (3,75 µg); EM-F7 (7,5 µg); MI (7,5 µg). Como controle positivo (C+) foi utilizada a peçonha de *Scorpaena plumieri* (1,88 µg), gentilmente cedida pela Dra. Suely Gomes de Figueiredo/Universidade Federal do Espírito Santo.

4.4.4. Atividade hemolítica

Nas condições utilizadas nos ensaios, a peçonha, bem como as frações obtidas do fracionamento por exclusão molecular, não apresentaram atividade hemolítica sobre eritrócitos de coelho.

4.4.5. Ação da peçonha de *M. lemniscatus* e de suas frações sobre células de adenocarcinoma de mama.

Para verificar a possível ação citotóxica da peçonha, bem como de suas frações, sobre uma linhagem tumoral, os ensaios foram realizados em células de adenocarcinoma de mama (MACL-1). A peçonha, bem como as frações EM-F1 e EM-F2 induziram a perda de adesão celular destas células. A peçonha promoveu perda de adesão celular até a concentração mínima de 12,5 µg/mL (dado não apresentado), enquanto EM-F1 e EM-F2 promoveram a mesma atividade até as concentrações mínimas de 3,12 µg/mL e 6,25 µg/mL, respectivamente, observado pela ausência de projeções celulares em algumas células (Figura 16). As outras frações não induziram perda de adesão celular.

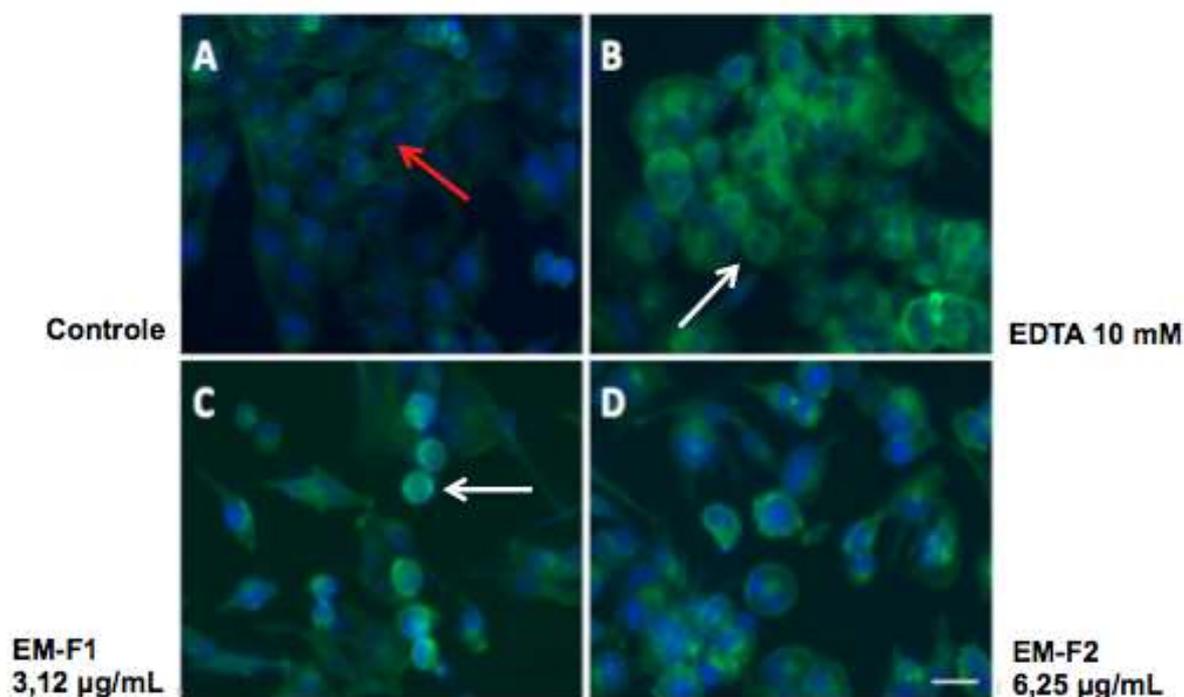


Figura 16: Ação das frações EM-F1 e EM-F2, obtidas do fracionamento da peçonha de *M. lemniscatus*, sobre células de adenocarcinoma de mama. Microscopia de fluorescência das células MACL-1 plaqueadas ($1,0 \times 10^5$ cels/mL) e cultivadas em condição controle (A), expostas à solução de EDTA 10 mM (B), à fração EM-F1 (3,12µg/mL) (C), ou à fração EM-F2 (6,25µg/mL) (D), por 24 horas, marcadas com DAPI (azul) e Faloidina (verde). Barra de escala : 50µm. A seta vermelha mostra projeções celulares, indicando adesão; setas brancas mostram ausência de projeções celulares, indicando perda de adesão celular.

4.4.6. Atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi detectada na peçonha e nas frações EM-F1 e EM-F2 somente contra a cepa *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™). A concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM) foram de 12,5 µg/mL para a peçonha, 3,12 µg/mL para EM-F1 e 6,25 µg/mL para EM-F2 (tabela 5).

Tabela 5: Valores de CIM e CBM para peçonha e frações EM-F1 e EM-F2 contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™)

<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC® 6538™)		
Amostras	CIM (µg/mL)	CBM (µg/mL)
Peçonha	12,5	12,5
EM-F1	3,12	3,12
EM-F2	6,25	6,25

4.5. Mapeamento das atividades biológicas induzidas pelas frações obtidas por exclusão molecular

A figura 17 mostra as atividades biológicas distribuídas ao longo do perfil cromatográfico obtido por exclusão molecular. As frações de alta massa (EM-F1 e EM-F2) induziram atividade antimicrobiana, hialuronidásica e de perda de adesão células de adenocarcinoma de mama. As frações EM-F3 a EM-F10, induziram atividade fosfolipásica A2, enquanto as frações EM-F6 e EM-F7, promoveram hemaglutinação.

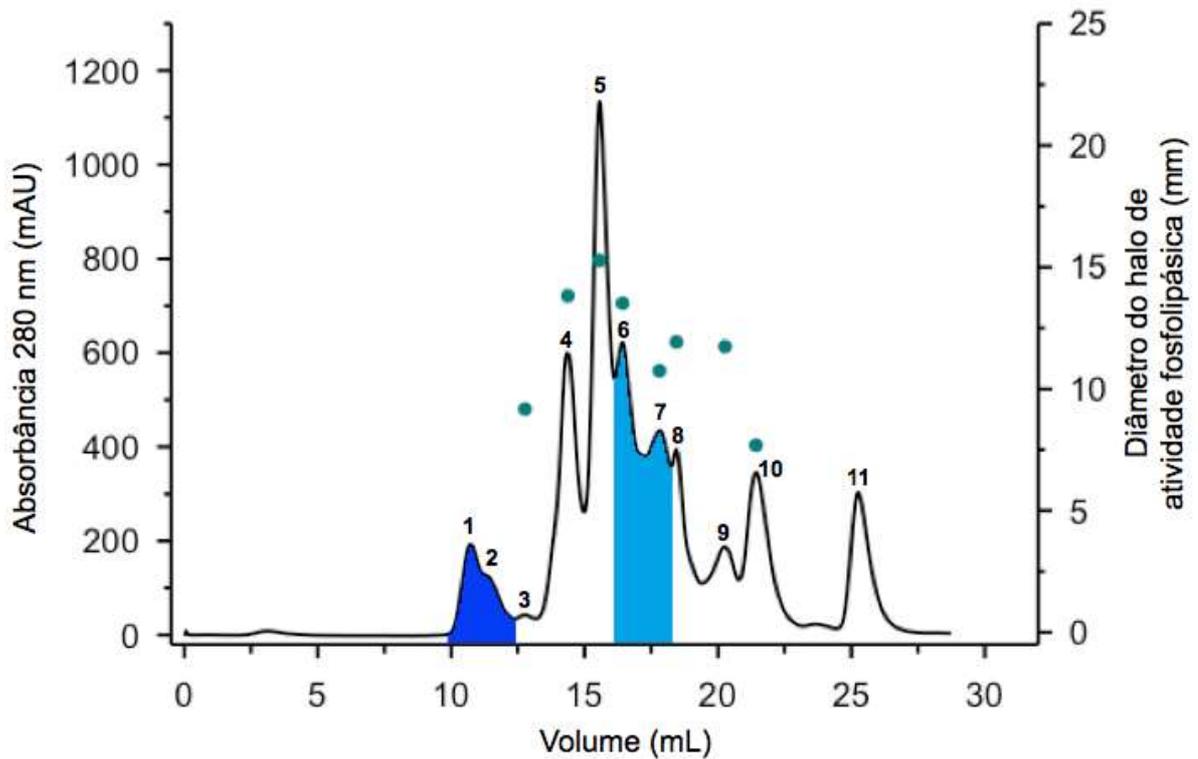


Figura 17: Perfil cromatográfico do fracionamento por exclusão molecular, mapeado de acordo com as atividades biológicas testadas. EM-F1 e EM-F2 (frações 1 e 2, identificadas em azul escuro) apresentaram atividade antimicrobiana, hialuronidásica e de perda de adesão celular; EM-F6 e EM-F7 (frações 6 e 7, identificadas em azul claro) apresentaram atividade hemaglutinante; a atividade fosfolipásica A2, identificada pela medição dos halos de atividade (mm) em uma placa de ágar, contendo gema de ovo, foi identificada nas frações EM-F3 a EM-F10 (3 a 10) e mostradas por pontos verdes.

4.6. Purificação do componente antimicrobiano de *M. lemniscatus* (MI-AM)

4.6.1. Segunda etapa de purificação: Cromatografia de troca aniônica

A fração com atividade antimicrobiana EM-F1, obtida no fracionamento por exclusão molecular (primeira etapa de purificação), foi submetida à cromatografia de troca aniônica (figura 18). EM-F1 foi resolvida em 3 frações, com recuperação de aproximadamente 50% do material inicial. A atividade antimicrobiana foi associada à fração 2, eluída com aproximadamente 20% de NaCl, denominada MI-AM (componente antimicrobiano de *Micrurus lemniscatus*), a qual representa aproximadamente 18% do material recuperado nessa etapa cromatográfica.

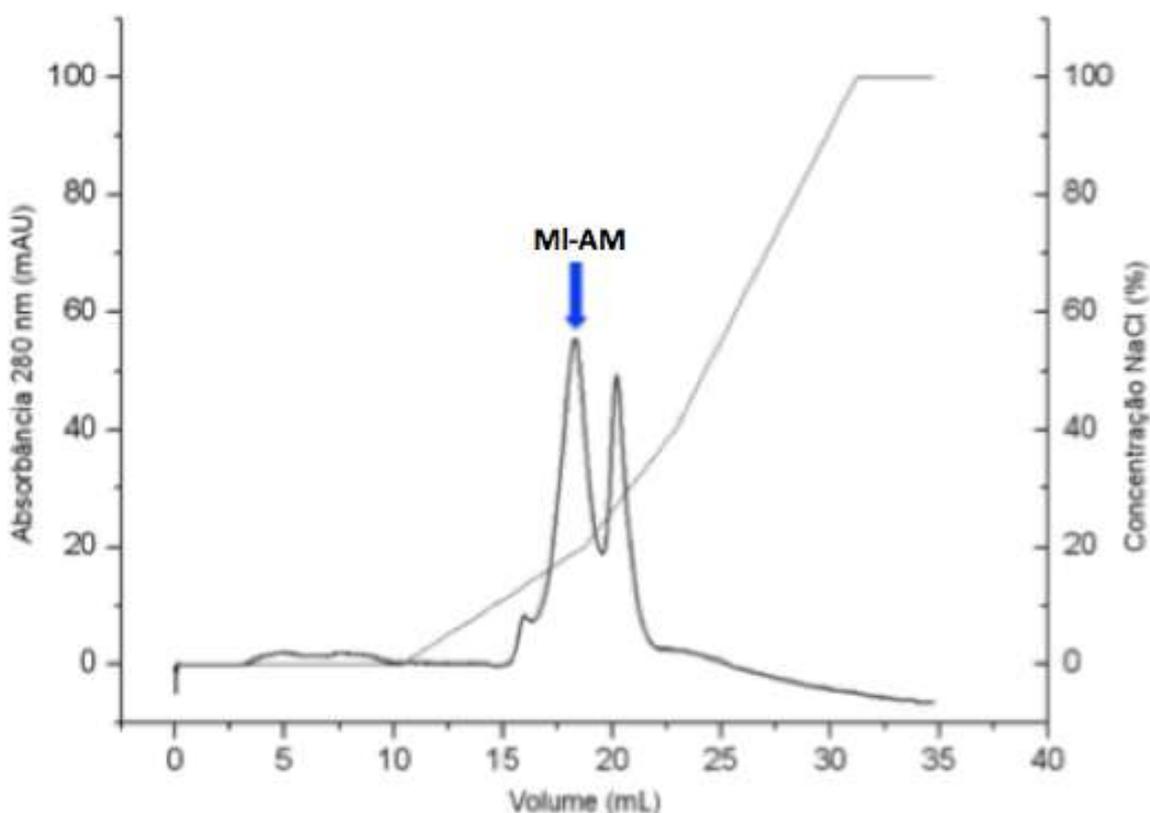


Figura 18: Perfil cromatográfico da segunda etapa do processo de purificação do MI-AM. EM-F1 (0,4 mg) foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna SynChropack AX 300 (250 x 4,6 mm) equilibrada com tampão fosfato de sódio (0,01 M) pH 7,0. As amostras foram eluídas em fluxo de 1,0 mL/min com tampão fosfato de sódio (0,01M) contendo 1,0 M NaCl pH 7,0, em um gradiente constituído de cinco etapas lineares (0% B em 10 min; 0 – 20% B em 10 min ; 20 - 40% B em 5 min ; 40 -100% B em 10 min ; 100% B em 15 min).

4.6.2. Terceira etapa de purificação: Cromatografia de fase reversa

Para obter o componente em forma homogênea, MI-AM obtido na etapa anterior, foi submetido à cromatografia de fase reversa, utilizando-se coluna analítica Vydac C4, a eluição mostrou dois picos simétricos, em 10 e 49% de ACN. A figura 19 mostra o perfil cromatográfico obtido.

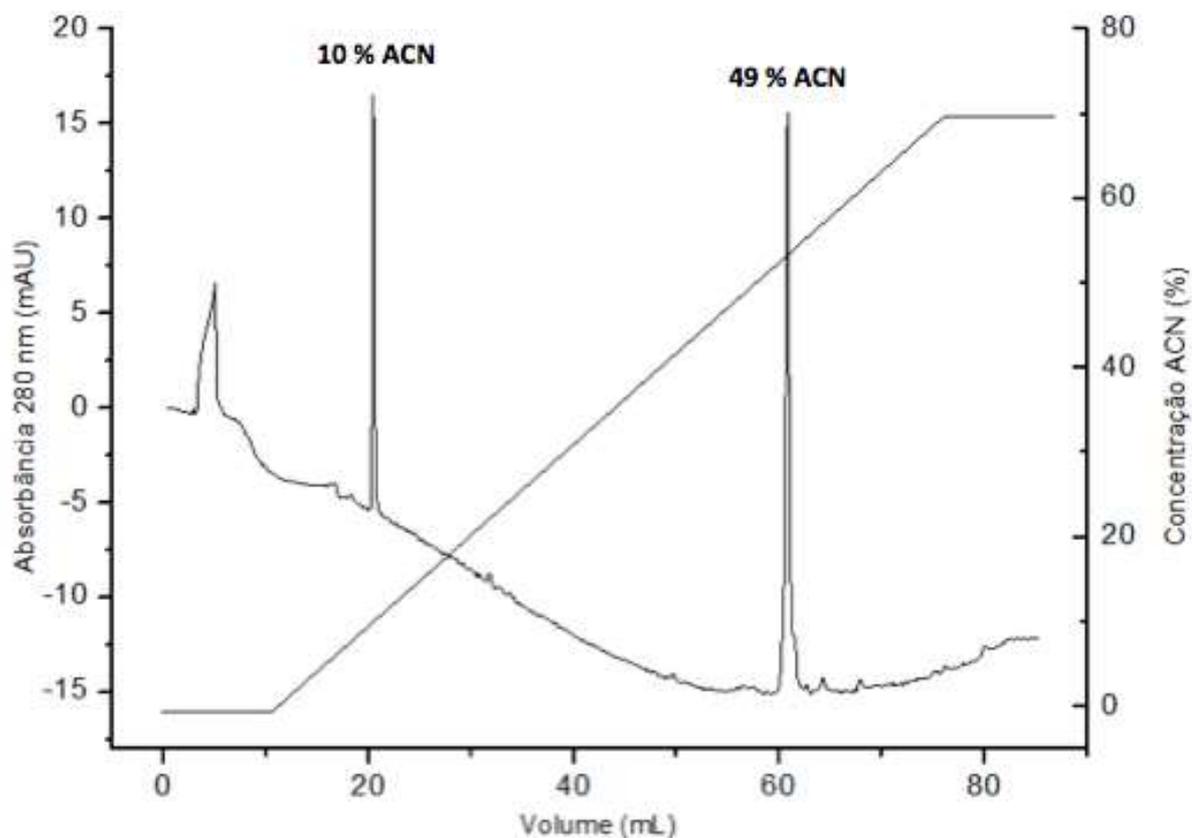


Figura 19: Perfil cromatográfico da terceira etapa de purificação de MI-AM. MI-AM (0,1 mg) proveniente da segunda etapa de purificação, foi submetido à cromatografia de fase reversa em coluna Vydac C4 analítica (250 x 4,6 mm), previamente equilibrada com solução A (0,1% de TFA em H₂O milli-Q®). As amostras foram eluídas em fluxo de 1,0 mL/min com solução B (0,1% de TFA em ACN) em um gradiente constituído de três etapas lineares (0% B em 10 min; 0 - 70% B em 70 min; 70% B em 10 min).

4.7. Avaliação da atividade antimicrobiana da MI-AM

A peçonha de *M. lemniscatus*, bem como EM-F1 e MI-AM, obtidos após as etapas de purificação por exclusão molecular e troca aniônica, respectivamente, foram avaliados contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™) para se determinar a concentração inibitória mínima (CIM) e a concentração bactericida mínima (CBM). A atividade antimicrobiana não foi detectada nas amostras obtidas em fase reversa. Os valores de CIM/CBM e IC₅₀ para a peçonha (12,50 µg/mL e 7,32 µg/mL), EM-F1 (3,12 µg/mL e 0,89 µg/mL) e MI-AM (1,58 µg/mL e 0,89 µg/mL) mostraram que MI-AM foi cerca de oito vezes mais ativo, em comparação com a peçonha (figura 20).

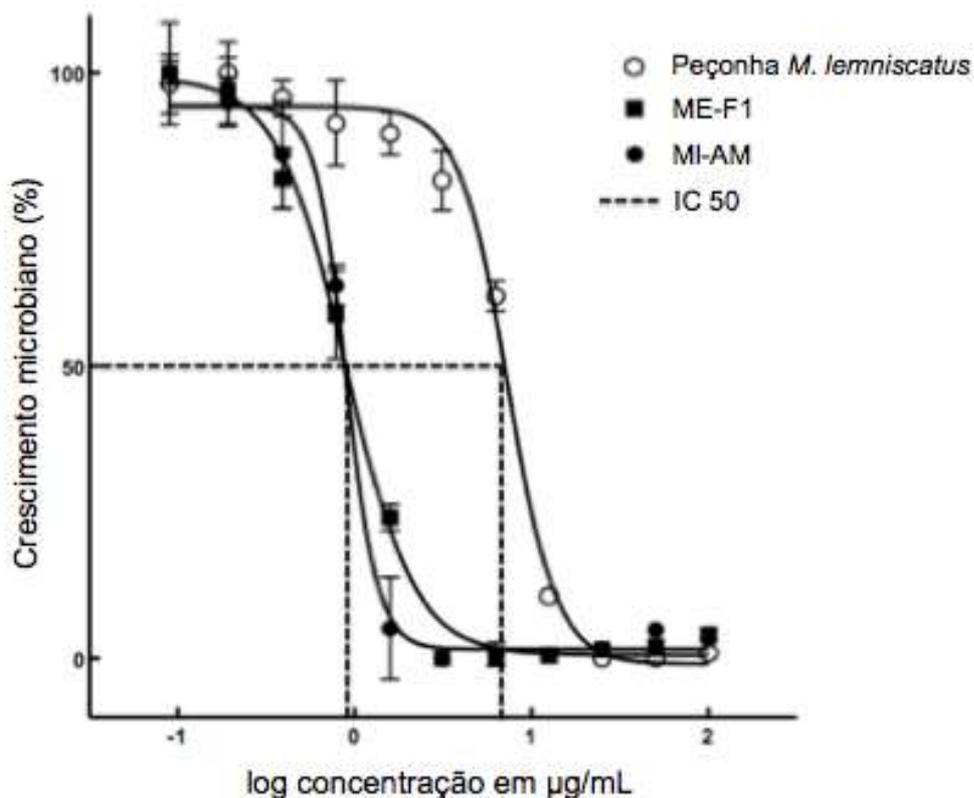


Figura 20: Curva de atividade antimicrobiana da peçonha, fração EM-F1 e MI-AM de *M. lemniscatus* contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™). Os dados de absorbância a 620 nm foram normalizados e plotados em função do log da concentração em µg/mL. Os valores de IC₅₀ foram indicados pelas linhas tracejadas. Para os detalhes metodológicos ver “Material e Métodos”, ítem 3.6.

4.8. Viabilidade/citotoxicidade celular do MI-AM

MI-AM, obtido por cromatografia de troca iônica, foi submetido a um ensaio de viabilidade/citotoxicidade, sobre três linhagens celulares: células hepáticas humanas (THLE-2), fibroblastos humanos (WI26-VA4) e células renais humanas (HEK-293). Na maior concentração utilizada (50 µg/mL), MI-AM foi tóxica, principalmente para as células hepáticas e para fibroblastos, evidenciado pela presença de núcleos vermelhos que indicam morte celular. Entretanto, nesta mesma concentração, foi observada uma menor toxicidade para células renais. Em concentrações mais baixas que 6,25 µg/mL, MI-AM apresentou baixa citotoxicidade para ambas as linhagens (Figura 21).

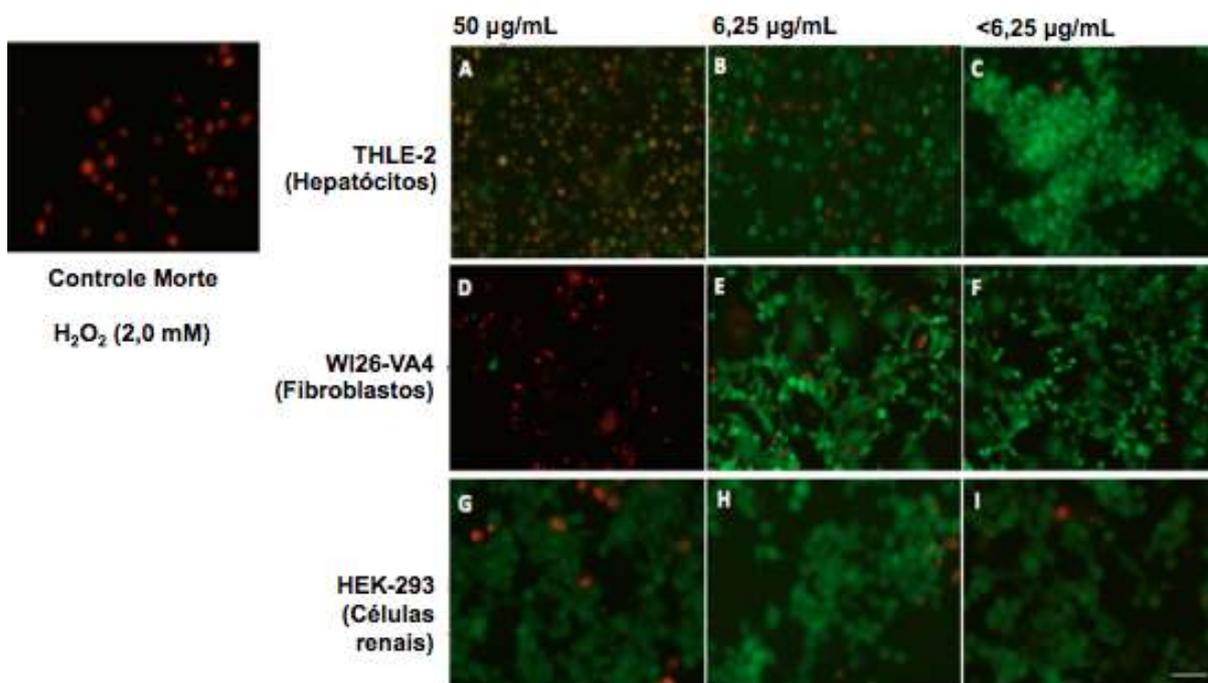


Figura 21: Ensaio de viabilidade/citotoxicidade das células THLE-2, WI26-VA4 e HEK-293. Microscopia de fluorescência das células THLE-2 (células hepáticas humanas) (ATCC® CRL-2706™) (A,B e C), WI26-VA4 (fibroblastos humanos) (ATCC® CCL 95.1™) (D,E e F) e HEK-293 (células renais humanas) (ATCC® CRL 1573™) (G,H e I) cultivadas em microplaca de ELISA de 96 wells ($1,0 \times 10^5$ cels/mL), expostas a concentrações de 50 µg/mL, 6,25 µg/mL e 3,12 µg/mL por 24 horas e marcadas com kit Live/Dead®. Coloração verde indica células viáveis e a coloração vermelha indica células mortas. Barra de escala: 50 µm.

Para quantificar a toxicidade induzida por MI-AM sobre as linhagens celulares utilizadas, foi realizado o ensaio de teste de MTT. Os resultados estão apresentados na figura 22. Observa-se que nas concentrações acima de 6,25 $\mu\text{g/mL}$, MI-AM apresentou maior citotoxicidade para as linhagens testadas, evidenciado pelo baixo número de células vivas. As concentrações abaixo de 6,25 $\mu\text{g/mL}$ induziram baixa citotoxicidade, o que é observado pelo aumento do número de células vivas e corrobora os estudos anteriores (Fig.21).

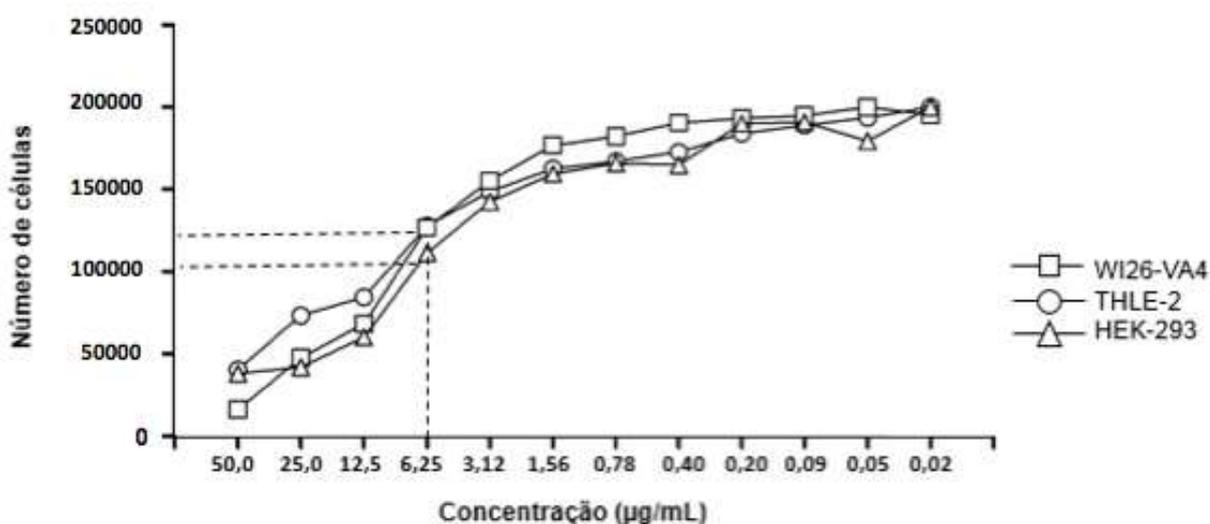


Figura 22: Gráfico mostrando a viabilidade/citotoxicidade das células THLE-2, WI26-VA4 e HEK-293, submetidas ao tratamento com MI-AM, em concentrações crescentes. O gráfico mostra concentrações de MI-AM ($\mu\text{g/mL}$) versus número de células vivas e foi plotado a partir dos resultados obtidos no teste de MTT, indicando que as células THLE-2, WI26-VA4 e HEK-293, expostas à MI-AM (6,25 $\mu\text{g/mL}$) não apresentaram variação significativa no número de células vivas.

4.9. Atividade de MI-AM sobre lipossomos

MI-AM não induziu a liberação de calceína encapsulada em lipossomos constituídos de L- α -fosfatidilcolina. Após 4 minutos da aplicação da amostra nos lipossomos, não houve observação da liberação de calceína, sugerindo que não houve lise da membrana lipossômica. Entretanto, imediatamente após a aplicação

de triton X-100, utilizado como controle positivo, a lise foi verificada, o que foi considerado como 100% (Figura 23).

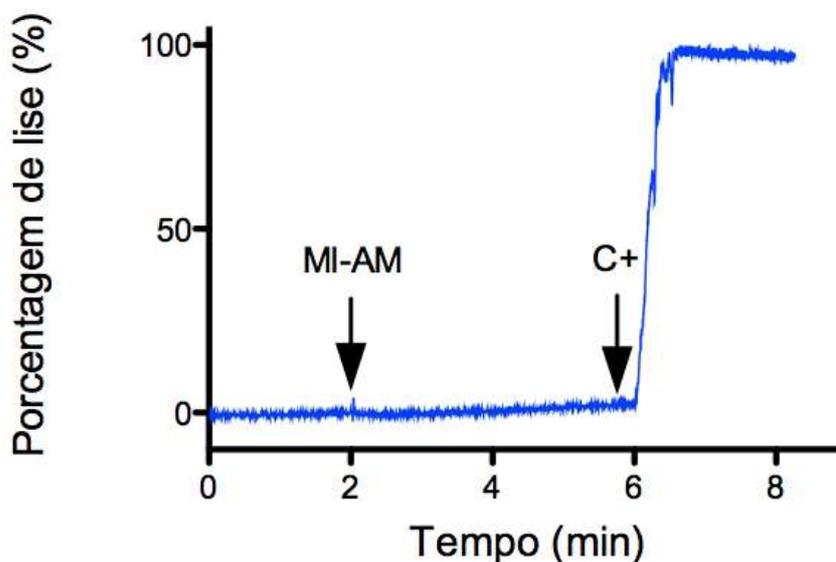


Figura 23: Efeito de MI-AM na liberação da sonda fluorescente calceína de lipossomos constituídos de L- α -fosfatidilcolina. Foram aplicados 50 μ g de MI-AM após dois minutos de incubação dos lipossomos, à 37 °C. O controle foi feito com a aplicação de 10 μ L de triton X-100 (10% v/v), o que foi considerado como de 100% de lise (C+) . A fluorescência foi registrada a cada 0,2 segundos. MI-AM não causou lise dos lipossomos. Para detalhes, ver “Material e Métodos”, ítem 3.8.

4.10. Caracterização Química do MI-AM

A figura 24 (A) mostra o perfil proteico, em SDS-PAGE, sob condições não redutoras, dos picos obtidos por cromatografia analítica, em fase reversa (ítem 4.6.2). Como pode ser observado, o pico eluído a 10% de ACN não apresentou nenhuma banda proteica enquanto que, o pico eluído a 49% de ACN (MI-AM), migrou como duas bandas principais, sendo a mais intensa, com massa equivalente a 70 kDa, e, a com menor intensidade, com a massa correspondente a 140 kDa. Essas massas moleculares foram estimadas pela curva padrão apresentada na figura 25.

A análise de MI-AM por espectrometria de massas, usando a técnica de MALDI TOF, revelou um espectro contendo um sinal de massa de maior intensidade

de 69.179 Da. Além disso, foi possível evidenciar sinais de 34.613 Da e 138.109 Da indicando, respectivamente, a dupla carga e o dímero formado (figura 24 B).

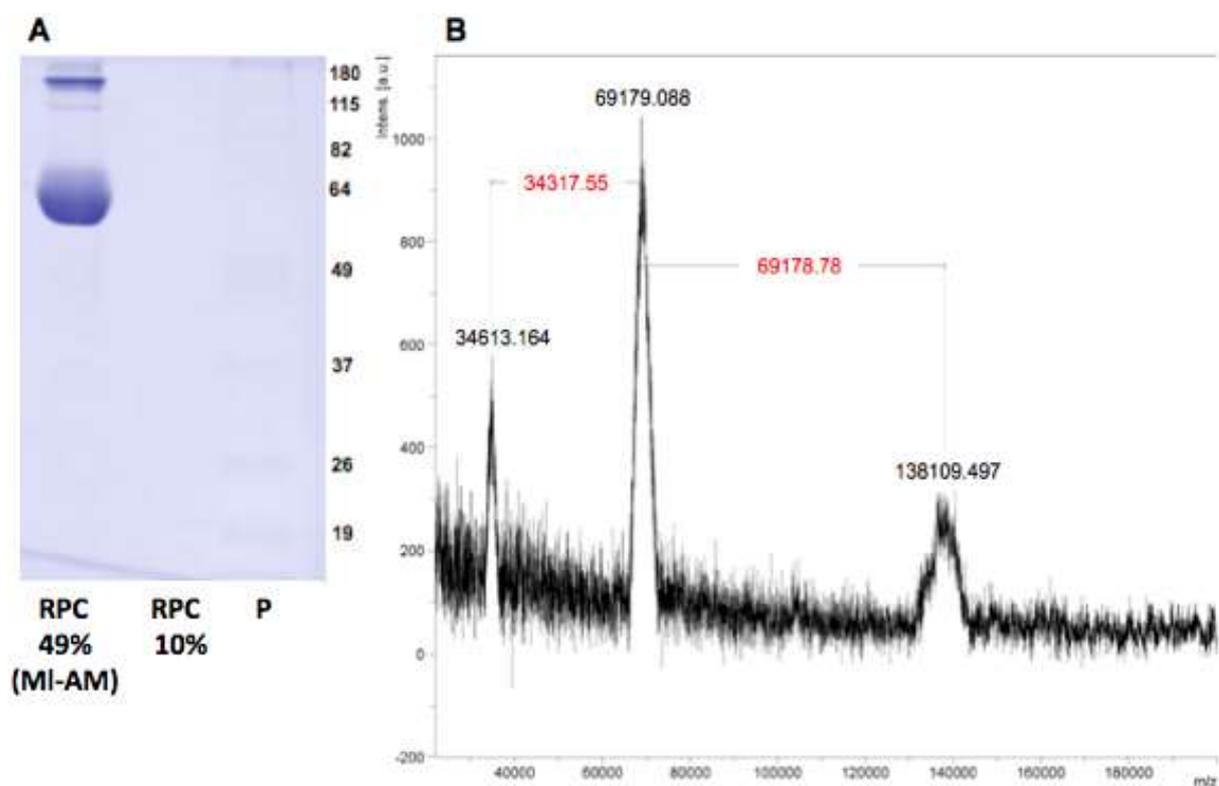


Figura 24: Perfil eletroforético (SDS-PAGE) e espectro de massas do componente antimicrobiano de *M. lemniscatus* (MI-AM). (A) Foram aplicados 15 µg de MI-AM após cromatografia de fase reversa (RPC 49% (MI-AM)); 15 µg do pico eluído a 10% de ACN (RPC 10%) e o padrão de massa molecular (P). (B) Espectro de massas MI-AM obtido por MALDI TOF, em modo positivo linear, mostrando um sinal principal de 69.179,088 Da. Observam-se sinais de 34.613,164 Da e 138.109,497 Da que indicam a dupla carga e o dímero, respectivamente.

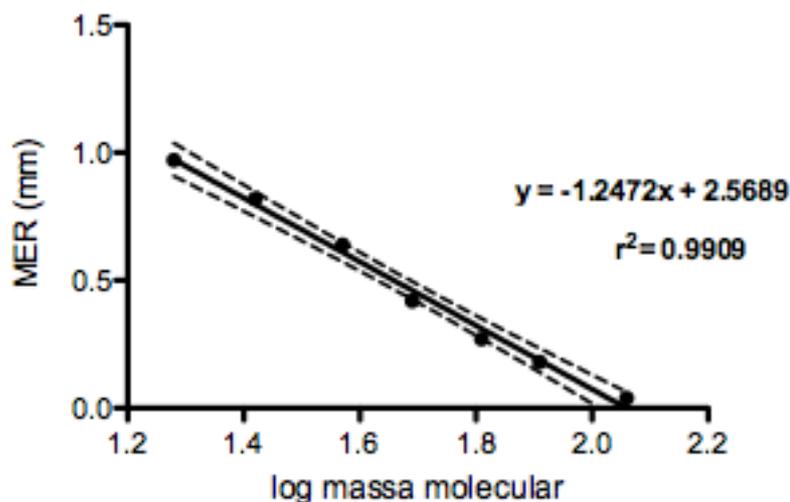


Figura 25: Curva padrão para estimativa de massa molecular de MI-AM. O gráfico foi plotado com os logaritmos das massas moleculares dos padrões proteicos (eixo x), em função da razão - mobilidade eletroforética relativa (MER) das proteínas padrão (eixo y). Dados obtidos em SDS-PAGE 12,5%.

Para avaliar se as bandas visualizadas no gel, bem como as massas detectadas por espectrometria de massas (figura 24 A e B) correspondem à dimerização do MI-AM, foi feito o estudo de *cross-linking* químico com BS₃. Para tal, MI-AM foi incubado tanto na ausência, quanto na presença do *cross-linker*, em concentrações crescentes e, posteriormente, os resultados foram avaliados em SDS-PAGE (7,5%). A figura 26 mostra o gel contendo o perfil proteico de oligomerização de MI-AM. Este ensaio demonstrou que, mesmo na ausência de BS₃, bandas proteicas de aproximadamente 130 kDa e 150 kDa já eram visualizadas, confirmando o sinal de aproximadamente 140 kDa, observado na análise por espectrometria de massas. Adicionalmente, com o aumento da concentração de BS₃ houve o aumento da intensidade dessas bandas e o surgimento de bandas proteicas de aproximadamente 190 kDa e 250 kDa, enquanto a banda com 70 kDa teve sua intensidade reduzida. Estes resultados sugerem a tendência de MI-AM formar oligômeros. As massas moleculares aparentes de todas as bandas obtidas foram estimadas pela curva padrão apresentada na figura 27.

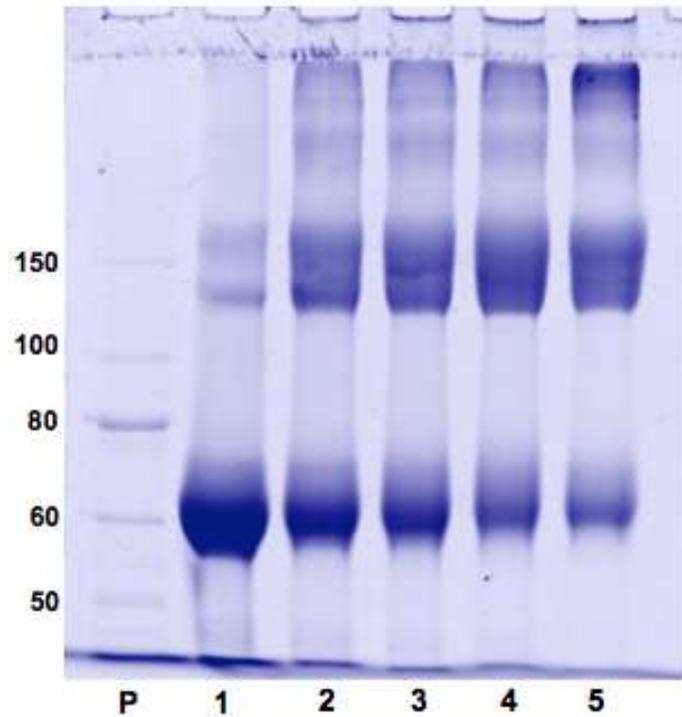


Figura 26: Ensaio de *cross-linking* químico de MI-AM com BS₃ (suberato bis-[sulfosuccinimidil]). MI-AM (5,6mg/mL) foi incubado na ausência (1) ou com diferentes concentrações de BS₃, conforme indicado abaixo. Os produtos foram analisados por SDS-PAGE (7,5%). P (padrão de massa molecular *Protein Ladder* 10 - 250 kDa); **1** (5,6 mg/mL MI-AM); **2** (5,6 mg/mL MI-AM + 1mM BS₃); **3** (5,6 mg/mL MI-AM + 2mM BS₃); **4** (5,6 mg/mL MI-AM + 5mM BS₃); **5** (5,6 mg/mL MI-AM + 10mM BS₃). Os resultados sugerem a natureza oligomérica da proteína em solução. Para outros detalhes ver “Material e Métodos”, ítem 3.9.

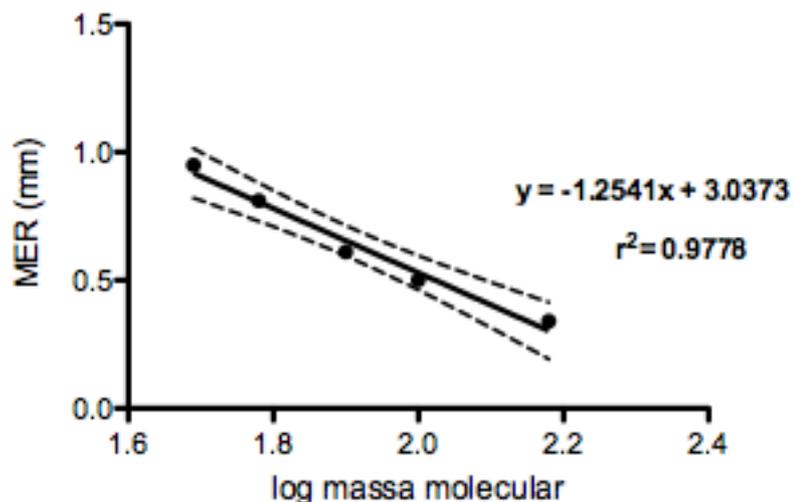


Figura 27: Curva padrão para estimativa de massas moleculares do MI-AM e de seus oligômeros. O gráfico foi plotado com os logaritmos das massas moleculares dos padrões em função da razão de suas mobilidades eletroforéticas relativas (MER). Dados obtidos em SDS-PAGE 7,5%.

4.11. Determinação da sequência de MI-AM

A banda do gel com massa molecular equivalente a 70kDa, correspondente à MI-AM (figura 24 A) foi recortada e digerida e, após redução e alquilação, os digestos foram submetidos à análise por espectrometria de massas MS/MS. Os dados foram analisados pelos softwares FlexAnalysis 3.3 e Biotools 3.2 (Bruker Daltonics). A análise de similaridade foi realizada por meio do sistema de busca Mascot (<http://matrixscience.com/cgi/nph-mascot.exe?1>) contra o banco de dados SwissProt.

Foi obtida uma sequência de 12 aminoácidos, que foi similar (escore de 109%, figura 28 B) com uma L-aminoácido oxidase, descrita previamente para a peçonha de *Bungarus fasciatus* (A8QL52-1; Uniprot), BF-LAAO (WEI *et al.*, 2009). O alinhamento usando-se o software Clustaw (<http://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalw2/>) revelou que o fragmento de MI-AM possui 100% de identidade com esta L-aminoácido oxidase (figura 28 A). Estas evidências sugerem que o componente antimicrobiano de *M. leminiscatus* pertence à classe das L-aminoácido oxidases, a qual foi denominada de MI-LAAO.

A

MI-LAAO		-----EADYEEFLEIAR-----	12
BF-LAAO	1	MNVFSIFSLVFLAAFGSCADDRRSALEECFR EADYEEFLEIAR NGLKKTSNPKHVVVVGAGMAGLSAAYVLAGAGHRVTL	80
MI-LAAO		-----	
BF-LAAO	81	LEASDRVGGRVNTYRDEKEGWYVNMGPMRLPERHRIVRTYIAKFGLKLNEFFQENENAWYFIRNIRKRVWEVKKDPGVFK	160
MI-LAAO		-----	
BF-LAAO	161	YPVKPSEEGKSASQLYRESLKKVIEELKRTNCSYILDKYDTYSTKEYLIKEGNLSRGAVDMIGDLLNEDSSYYLSFTIESL	240
MI-LAAO		-----	
BF-LAAO	241	KNDDLFSYEKRFDEISDGFQQLPKSMHQAIEMVHLNAQVIKIQRDAEKVRVAYQTPARTLSYVTADYVIVCATSRVRR	320
MI-LAAO		-----	
BF-LAAO	321	ISFEPPLPPKKAHALRSIHYSATKIFLTCRKFWEADGIHGGKSTTDLPSTRFIYYPNHNFTSGVGVIVAYVLADDSDF	400
MI-LAAO		-----	
BF-LAAO	401	QALDIKTSADIVINDLSLIH	420

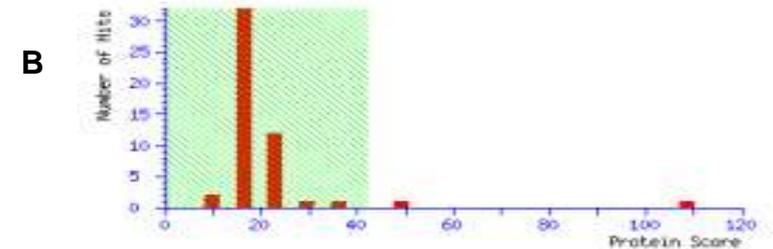


Figura 28. Similaridades entre as sequências de MI-LAAO e BF-LAAO. (A) A sequência de MI-AM (MI-LAAO) obtida após análise por espectrometria de massas MS/MS, seguida de avaliação pelos softwares FlexAnalysis 3.3 e Biotoools 3.2 (Bruker Daltonics), foi alinhada por similaridade com a sequência de BF-LAAO da peçonha de *Bungarus fasciatus* (A8QL52-1; Uniprot) (WEI *et al.*, 2009) utilizando-se o software ClustalW; (B) Escore de proteínas de 109 demonstrando alta confiabilidade no resultado obtido.

5. DISCUSSÃO

As peçonhas de serpentes constituem uma mistura composta por uma variedade de peptídeos e proteínas, além de outros componentes orgânicos e inorgânicos, que podem ser empregados para a defesa e para obtenção de alimentos, por estes animais (TASHIMA *et al.*, 2012). Acidentes envolvendo serpentes peçonhentas são comuns em várias regiões do mundo, bem como no Brasil onde são atribuídos principalmente, aos gêneros *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis* e *Micrurus* (CHIPPAUX, 2015). Em geral, esses envenenamentos podem induzir graves efeitos nas vítimas, tais como neurotoxicidade, miotoxicidade, cardiotoxicidade, hemorragias e lesões locais (TAN & PONNUDURAI, 1992; TANAKA *et al.*, 2010).

Muitos estudos têm sido realizados para melhor compreender a patofisiologia dos envenenamentos e também para definir novas estratégias para o tratamento das vítimas. Adicionalmente, o interesse em isolar e caracterizar proteínas e peptídeos dessas misturas tem aumentado devido ao potencial biotecnológico e terapêutico que apresentam (DA SILVA *et al.*, 2014).

Entretanto, caracterizações bioquímicas e farmacológicas dos componentes de peçonhas de algumas espécies, como no caso, *Micrurus lemniscatus*, são escassas devido à dificuldades na correta identificação das espécies, na manutenção dos indivíduos em cativeiro, na extração da peçonha e, principalmente, devido à pequena quantidade de material obtido por espécime. Além disso, variações individuais na composição dessas peçonhas, atribuídas à diferente distribuição geográfica, idade, sexo e dieta, também dificultam esses estudos (GUTIÉRREZ J.M. *et al.*, 1980; CHIPPAUX J.P. *et al.*, 1991; TANAKA *et al.*, 2010).

No presente estudo, a peçonha da *M. lemniscatus* e suas frações obtidas por exclusão molecular, foram investigadas quanto às atividades fosfolipásica A2, hialuronidásica, hemaglutinante, hemolítica e antimicrobiana. Também foi avaliada a ação destes componentes sobre as células de adenocarcinoma de mama (figura 17).

Após o fracionamento da peçonha por exclusão molecular, em coluna Superose 12 HR (1,0x30mL), foram obtidas 11 frações (EM-F1 a EM-F11) as quais apresentaram recuperação proteica de cerca de 64%. Do material recuperado, 6,7% correspondeu às frações que eluíram primeiramente (EM-F1 e EM-F2), 88,8% às frações EM-F3 a EM-F10 e 4,5% à EM-F11 (figura 8 e tabela 3).

Similarmente, Da Silva Jr e colaboradores (1991) fracionaram peçonhas de diferentes espécies de *Micrurus* (incluindo *M. lemniscatus*), também por exclusão molecular, utilizando-se da mesma coluna. As frações com massas moleculares mais altas (101 - 140 kDa) representaram cerca de 8,8% enquanto que, as frações com massas moleculares mais baixas (6,4 - 10,3 kDa) representaram cerca de 71% da constituição da peçonha.

Nossos resultados de eletroforese em gel e a análise por espectrometria de massas apresentaram o perfil proteico e a distribuição de massas da peçonha de *M. lemniscatus* e suas 11 frações. Em SDS-PAGE (figura 9), as frações EM-F1 e EM-F2 apresentaram bandas mais intensas com a maior massa molecular estimada, cerca de 70 kDa. Entretanto, a maioria das bandas obtidas foram estimadas entre 7 e 26 kDa (frações EM-F3 a EM-F11), sendo que as bandas em maior número e intensidade foram estimadas entre 7 e 9 kDa (frações EM-F5 a EM-F11) o que corrobora com os estudos de Alape-Girón *et al* (1994) e Tanaka e colaboradores (2010).

A análise por espectrometria de massas do tipo MALDI TOF (figura 11) mostrou que as frações EM-F1 e EM-F2 apresentaram sinais de massas moleculares em torno de 70 kDa, enquanto que, as frações EM-F3 a EM-F11 apresentaram sinais de massas moleculares em torno de 6 - 26 kDa, sendo que os picos mais intensos foram em torno de 6 a 8 kDa e 12 a 14 kDa. Os valores de massas moleculares obtidos, tanto por espectrometria de massas, quanto por eletroforese em gel, devem corresponder às α -neurotoxinas (3FTx) e fosfolipases A2 (PLA2), os principais componentes da peçonha de *M. lemniscatus* (DA SILVA JR *et al.*, 1991; TAN & PONNUDURAI, 1992; CISCOTTO *et al.*, 2011).

No presente trabalho, a atividade fosfolipásica A2 desta peçonha foi cerca de quarenta vezes maior do que a verificada para a peçonha de *C. d. terrificus*, que foi utilizada como comparativo (tabela 4) (SANTORO *et al.*, 1999). As frações EM-F3 a EM-F10 (cerca de 88,8% do material obtido do fracionamento por exclusão molecular) apresentaram esta atividade, sendo que as frações EM-F4, EM-F5 e EM-F6, com maior concentração proteica, foram as mais ativas. Entretanto, as frações EM-F3 e EM-F9, com menor concentração proteica, apresentaram atividade fosfolipásica A2 relativamente alta, o que indica que, grande parte dos componentes presentes nessas frações são PLA2 (figura 13).

Estudos anteriores demonstraram que a peçonha de *M. lemniscatus*, em comparação com as de outras espécies de *Micrurus*, foi uma das que apresentou maior atividade fosfolipásica A2 (AIRD & DA SILVA JR, 1991; CECCHINI *et al.*, 2005; TANAKA *et al.*, 2010). Quatro PLA2s neurotóxicas (Mlx-8, Mlx-9, Mlx-11 e Mlx-12) já foram isoladas da peçonha de *M. lemniscatus*. Essas moléculas tem massas moleculares em torno de 7 a 22 kDa e são capazes de induzir distúrbios comportamentais, convulsões e degeneração tecidual (OLIVEIRA *et al.*, 2008).

As hialuronidases, componentes também encontrados em peçonhas de serpentes, agem como fatores de difusão da peçonha, degradando o ácido hialurônico presente na matriz extracelular, assim como os substratos sulfato de condroitina A, B e C (GIRISH *et al.*, 2002). No presente trabalho, verificou-se atividade hialuronidásica sobre o substrato ácido hialurônico por zimografia, na peçonha e nas frações EM-F1 e EM-F2 (figura 14). As bandas com halos translúcidos, indicando atividade, apresentaram massa molecular de cerca de 70 kDa. A especificidade da hialuronidase, encontrada nas frações EM-F1 e EM-F2, a diferentes substratos, mostrou que esta enzima apresenta elevada atividade sobre o ácido hialurônico e degrada parcialmente os sulfatos de condroitina A, B e C (dados não apresentados). De acordo com Aird & Da Silva Jr (1991), a atividade hialuronidásica na peçonha de *M. lemniscatus* foi, aparentemente, ausente. Entretanto, estudos comparativos com diferentes peçonhas de *Micrurus* demonstraram que a de *M. lemniscatus* é uma das que apresenta maior atividade hialuronidásica (TAN & PONNUDURAI, 1992; TANAKA *et al.*, 2010). Girish e colaboradores (2004) isolaram a hialuronidase NNH1 da peçonha da serpente *Naja naja* (família *Elapidae*), com massa molecular de 70.406 Da e atividade específica sobre ácido hialurônico, características parecidas com as encontradas nas frações com atividade hialuronidásica de *M. lemniscatus*. Vale ressaltar que, até o presente momento, não foram publicados trabalhos com hialuronidases isoladas de peçonhas de *Micrurus*.

As lectinas do tipo-C de peçonhas de serpentes são moléculas homodiméricas, que interagem com carboidratos presentes nas membranas de eritrócitos, causando a hemaglutinação dessas células (ZHA *et al.*, 2001). São compostas por homodímeros com cerca de 30 kDa, necessitam de íons Ca^{2+} para serem ativas, correspondem a 1% ou menos da composição das peçonhas de serpentes e são amplamente estudadas em peçonhas de serpentes da família

Viperidae (KOMORI *et al.*, 1999). Entretanto, existem poucos estudos sobre lectinas do tipo-C em peçonhas de serpentes da família *Elapidae*, dentre as quais citamos: uma lectina do tipo-C ligante de lactose, isolada da peçonha de *Dendroaspis jamesoni*, uma lectina do tipo-C ligante de manose, de *Oxyuranus scutellatus* e sequências de cDNA de glândulas de peçonhas, para lectinas do tipo-C de serpentes do gênero *Bungarus* e da espécie *M. corallinus* (OGILVE *et al.*, 1986; ZHA *et al.*, 2001; EARL *et al.*, 2011). Além disso, estudos proteômicos, demonstraram a presença de precursores de lectinas do tipo-C na peçonha de *M. lemniscatus*, por similaridade com *M. corallinus* (CISCOTO *et al.*, 2011).

Tendo em vista a evidência de precursores de lectinas do tipo-C na peçonha *M. lemniscatus*, e, sabendo-se que essas moléculas causam atividade hemaglutinante, a peçonha e as frações obtidas no presente trabalho foram submetidas a ensaio de hemaglutinação, o qual demonstrou que tanto a peçonha, quanto as frações EM-F6 e EM-F7, apresentam esta atividade sobre eritrócitos de coelho (2%) (figura 15). Nas condições experimentais testadas, a peçonha e a fração EM-F7 induziram aglutinação até baixas concentrações, i.e, 7,5 µg. Adicionalmente, a fração EM-F6 foi a mais ativa, causando o mesmo efeito na quantidade de 3,75 µg (figura 15). É interessante ressaltar que, no presente trabalho, foram identificadas, massas moleculares em torno de 16 kDa e 32 kDa, para as frações EM-F6 e EM-F7 respectivamente, o que sugere a presença de lectinas do tipo-C na peçonha de *M. lemniscatus*.

Moléculas de adesão celular (caderinas, integrinas, selectinas e membros da superfamília das imunoglobulinas) são proteínas de superfície que favorecem a interação célula-célula ou célula-matriz, estabelecendo uma estrutura tecidual que garante as funções fisiológicas (MAKRILIA *et al.*, 2009). Alguns estudos demonstraram que, modificações na expressão ou bloqueio destas moléculas (principalmente pela interação de desintegrinas), podem alterar o estado adesivo, ou mesmo a sinalização de células tumorais, o que poderia favorecer um fenótipo menos invasivo levando à regressão do tumor, uma vez que se reduz a superfície de contato entre as células malignas (CAVALLARO *et al.*, 2004; KUNER *et al.*, 2008; BURK *et al.*, 2014; XIN *et al.*, 2015).

Neste estudo, embora não quantificado, observou-se que a peçonha de *M. lemniscatus* e suas frações EM-F1 e EM-F2, induziram a perda da adesão das células de adenocarcinoma de mama (MACL-1) (figura 16). As células expostas a

estas frações perderam suas projeções celulares assumindo uma forma arredondada, condizente com o perfil de células que perdem sua adesão. Estudos mais aprofundados precisam ser realizados para a melhor compreensão destes resultados, ainda preliminares.

Uma outra atividade avaliada, para a peçonha e suas frações, foi a antimicrobiana, na qual a peçonha e as frações EM-F1 e EM-F2 apresentaram efeito bactericida apenas contra a cepa *S. aureus* (ATCC® 6538™). Destas frações, EM-F1 foi a mais ativa, com CIM e CBM de 3,12 µg/mL (tabela 5).

De acordo com a Organização Mundial de Saúde, infecções bacterianas estão entre as 10 principais causas de mortes no mundo, especialmente devido à presença e emergência de cepas multirresistentes aos antibióticos convencionais, tais como sulfonamida, penicilina, meticilina, vancomicina e beta-lactâmicos, o que tem aumentado os riscos dessas infecções e tornado o tratamento mais difícil. Em vista disso, o interesse na investigação de novos agentes antimicrobianos seguros e eficazes a partir de produtos naturais tem aumentado nos últimos anos (WHO, 2011; PELGRIFT & FRIEDMAN, 2013; COSTA *et al.*, 2015).

Muitos estudos tem sido conduzidos com proteínas e peptídeos isolados de peçonhas de serpentes, em busca de agentes antimicrobianos. Os principais componentes de peçonhas de serpentes conhecidos com essa atividade são as L-aminoácido oxidases (LAAOs), as fosfolipases A2 (PLA2) e os peptídeos antimicrobianos (PAMs). Entretanto, a eficácia e a distribuição desses componentes diferem entre as espécies (PHUA *et al.*, 2012).

L-aminoácido oxidases (LAAOs) de peçonhas de serpentes são flavoenzimas (contém o co-fator FAD) que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos formando α -cetoácidos, peróxido de hidrogênio e amônia. São agentes terapêuticos promissores devido a diversas atividades biológicas que apresentam, como, por exemplo, a antimicrobiana (ZHANG *et al.*, 2004; RODRIGUES *et al.*, 2009).

No presente estudo, o componente antimicrobiano isolado da peçonha de *M. lemniscatus* foi identificado como uma LAAO (denominada de MI-LAAO), uma vez que este apresentou similaridade com BF-LAAO, isolada da peçonha da serpente *Bungarus fasciatus* (família Elapidae) (figura 28 A). A sequência de MI-LAAO (EADYEEFLEIAR) foi identificada a partir da digestão, redução e alquilação de bandas extraídas do SDS-PAGE, das amostras aplicadas ao gel, provenientes de cada etapa de purificação (exclusão molecular - EM-F1; troca aniônica - MI-AM; fase

reversa - MI-LAAO) (figuras 8, 18 e 19) e pela análise dos fragmentos de peptídeos, por espectrometria de massas MS/MS. Apesar da baixa cobertura de MI-LAAO (sequência de 12 aminoácidos) pelo peptídeo obtido, no alinhamento com BF-LAAO, o escore proteico foi de 109, indicando uma alta confiabilidade no resultado obtido (figura 28 B).

Além disso, nosso estudo mostrou outras evidências de que o componente antimicrobiano de *M. lemniscatus* é uma LAAO. Após MI-LAAO ser submetida à cromatografia de fase reversa analítica (última etapa de purificação) (figura 19), foram obtidos dois picos, eluídos a 10% e 49% de ACN. O primeiro apresentou uma solução de cor amarela e não exibiu bandas proteicas em SDS-PAGE (figura 24 A), sugerindo que este material possa ser o cofator FAD, uma micromolécula, ligada às LAAOs e responsável por conferir a coloração amarela à algumas peçonhas, como demonstrado pela literatura (ZHANG *et al.*, 2004). Por outro lado, o pico eluído a 49% de ACN (MI-LAAO) apresentou, em SDS-PAGE, uma banda principal com massa molecular de cerca de 70 kDa, assim como uma banda de cerca de 140 kDa (figura 24 A). Esse resultado foi confirmado por espectrometria de massas, onde se observou um sinal mais intenso de 69,179 kDa, além de sinais menos intensos de 34,613 kDa e de 138,109 kDa, sugerindo, respectivamente, a dupla carga da molécula e a formação de um dímero (figura 24 B).

O estudo de *cross-linking* químico confirmou a tendência de MI-LAAO formar oligômeros, demonstrando que, em condições nativas, a molécula forma dímeros em torno de 140 kDa e que, com o aumento da concentração de BS₃ (*cross-linker*) a intensidade das bandas de cerca de 70 kDa diminuem e a proteína tende a formar, além de dímeros, trímeros em torno 210 kDa (figura 26). Estes resultados corroboram com aqueles obtidos para a LAAO isolada da peçonha de *Naja naja oxiana*, uma glicoproteína com massa molecular monomérica em torno de 57 kDa, capaz de formar dímeros com massa em torno de 110 kDa em sua forma nativa (SAMEL *et al.*, 2008). Em geral, LAAOs isoladas de peçonhas de serpentes são homodímeros associados de forma não-covalente, com subunidades de 50 - 70 kDa (DU & CLEMETSON, 2002; TAN & FUNG, 2008). Alguns exemplos são LAAOs homodiméricas isoladas de *Bothrops alternatus* e *Bothrops moojeni* possuem subunidades com 66 kDa e 64,8 kDa, respectivamente (STÁBELI *et al.*, 2004; STÁBELI *et al.*, 2007).

MI-LAAO, após cromatografia de troca aniônica, apresentou atividade antimicrobiana contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), com CIM e CBM de 1,58 µg/mL e IC₅₀ de 0,893 µg/mL (oito vezes mais ativa que a peçonha) (figura 20). Esse resultado pode indicar a especificidade de MI-LAAO sobre alguns tipos de bactérias gram-positivas. Similarmente, algumas LAAOs de peçonhas de serpentes também apresentaram maior especificidade contra cepas de bactérias gram-positivas. Cc-LAAO isolada da peçonha de *Cerastes cerastes* apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias do gênero *Staphylococci*, com valores de CIM de 10,0 a 20,0 µg/mL (HANANE-FADILA & FATIMA, 2014). Phua e colaboradores (2012) isolaram Oh-LAAO de *Ophiophagus Hannah* a qual apresentou baixos valores de CIM para cepas de *S. aureus*, além de ser capaz de inibir o crescimento de outras bactérias gram-positivas e também gram-negativas. Além disso, CR-LAAO, isolada de *Calloselasma rhodostoma*, também foi mais específica contra *S. aureus*, apresentando baixos valores de CIM e CBM (COSTA *et al.*, 2015).

Após fase reversa, MI-LAAO (eluído a 49% ACN) não exibiu atividade antimicrobiana. É possível que o solvente orgânico (ACN) utilizado nessa etapa cromatográfica tenha desnaturado e/ou inativado a enzima, por alterar sua estrutura ou mesmo por separar o co-fator FAD (eluído a 10% ACN) (figura 19), ou ambos.

A citotoxicidade apresentada por MI-LAAO sobre as linhagens celulares THLE-2 (hepatócitos humanos), WI26-VA4 (fibroblastos humanos) e HEK-293 (células renais humanas) (figuras 21 e 22) demonstraram que este componente parece menos ativo nestas células, se compararmos aos seus valores de CIM e CBM contra *S. aureus* (ATCC® 6538™) (1,58 µg/mL). Tal resultado reforça a ideia de que MI-LAAO poderia ser usado e modificado para minimizar os eventuais danos teciduais causados pelo seu metabolismo em órgãos como fígado e rim, uma vez que é necessário uma concentração pouco citotóxica para obter o efeito desejado sobre a bactéria testada.

Com o objetivo de compreender o possível modo de ação sobre *S. aureus*, MI-LAAO (50 µg) foi adicionado a lipossomos constituídos de L- α -fosfatidilcolina, e observou-se que não houve liberação de calceína encapsulada (figura 23), indicando que este componente não causa lise neste tipo de membrana. Além disso, nem a peçonha de *M. lemniscatus* e nenhuma de suas frações obtidas por exclusão molecular induziram hemólise sobre eritrócitos de coelho (2,0%).

Sabe-se que o efeito antimicrobiano de LAAOs de peçonhas de serpentes é devido à liberação de peróxido de hidrogênio na reação de catálise, uma vez que a adição de catalase suprime completamente a atividade antimicrobiana (TAN & FUNG, 2008). Estudos de microscopia eletrônica sugeriram que o peróxido de hidrogênio gerado induz a ruptura da membrana bacteriana, resultando na morte da célula (TOYAMA *et al.*, 2006). Uma LAAO isolada de *Agkistrodon halys* foi capaz de se ligar à superfície de bactérias e de gerar altas concentrações de peróxido de hidrogênio no local, causando a inibição do crescimento bacteriano (ZHANG *et al.*, 2004). Entretanto, os mecanismos detalhados da ação de LAAOs sobre bactérias ainda não são bem compreendidos, sendo necessários estudos mais aprofundados.

6. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O estudo das peçonhas de serpentes, além de ser importante para o desenvolvimento de terapias contra os envenenamentos, explora-as como valiosas fontes de moléculas que podem ser utilizadas como protótipos para o desenvolvimento de fármacos e de outros produtos biotecnológicos. Neste trabalho, caracterizamos várias propriedades biológicas da peçonha de *M. lemniscatus* e de suas frações, as quais apresentaram atividades fosfolipásica A2, hialuronidásica, hemaglutinante e antimicrobiana, além de induzir perda de adesão celular de adenocarcinoma de mama, em cultura. Frente ao surgimento de microrganismos multirresistentes aos antibióticos comerciais e ao interesse em investigar agentes antimicrobianos a partir de fontes naturais, isolamos e caracterizamos química- e farmacologicamente MI-LAAO, a primeira L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de *M. lemniscatus*. Esta enzima apresentou atividade antimicrobiana e bactericida contra *Staphylococcus aureus* (ATCC® 6538™), apresentou baixa toxicidade em células normais em cultura e, além de não causar hemólise em eritrócitos de coelho, não induziu lise de lipossomos. A figura 29 mostra um resumo esquemático deste trabalho. Novos estudos são necessários para explorar as atividades biológicas da peçonha de *M. lemniscatus*, assim como para caracterizar melhor a atividade enzimática de MI-LAAO, compreender seu mecanismo de ação sobre bactérias, e avaliar, não somente sua atividade antimicrobiana frente a outras cepas de microrganismos, mas, também, outras atividades biológicas características de LAAOs de serpentes.

7. CONCLUSÃO GERAL

Este estudo nos permitiu caracterizar várias propriedades biológicas da peçonha de *Micrurus lemniscatus*, identificando alguns componentes tóxicos e evidenciando seu potencial biotecnológico, conforme detalhado acima.

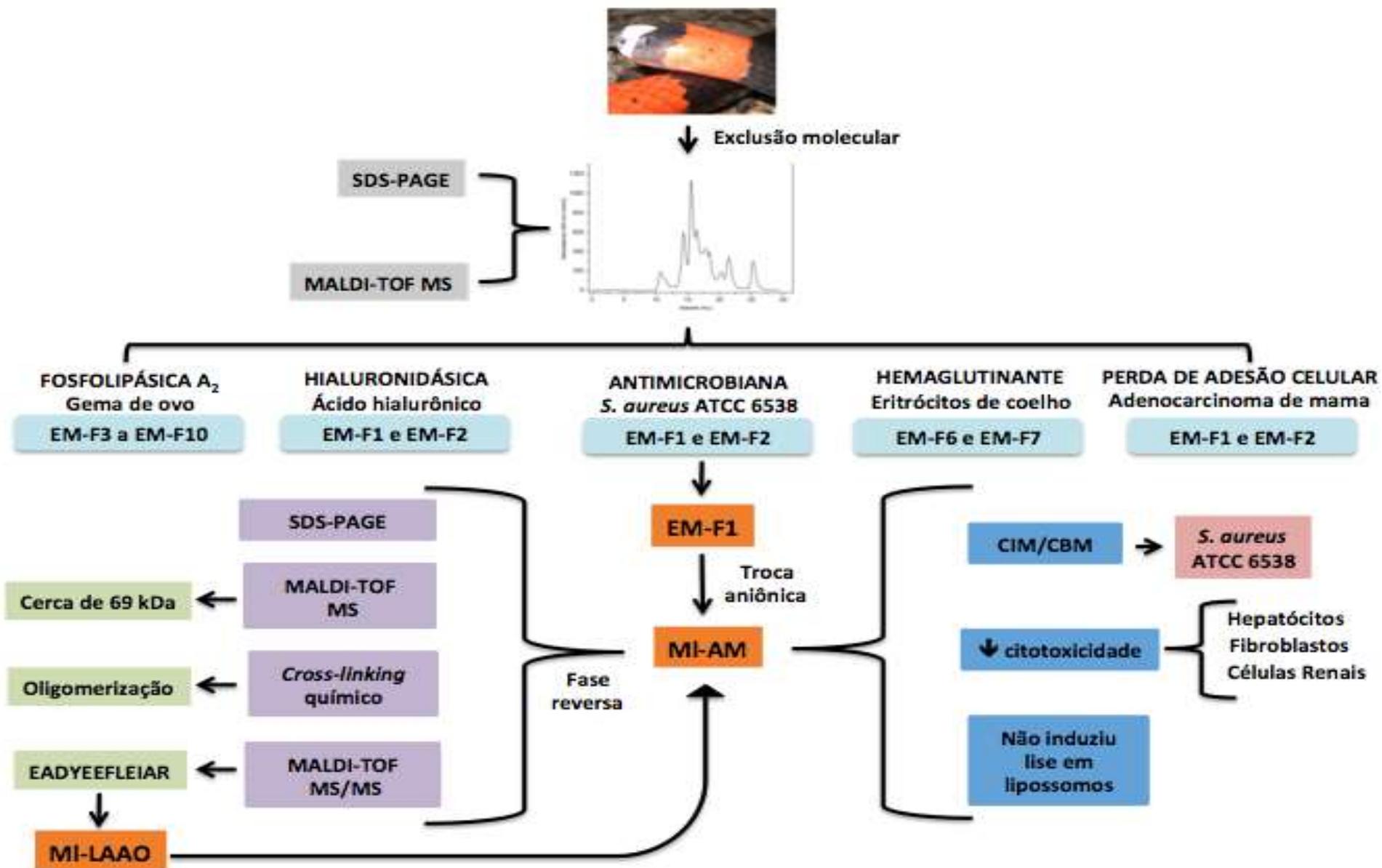


Figura 29. Resumo esquemático do trabalho. A peçonha de *M. lemniscatus*, cedida gentilmente pelo Serviço de Animais Peçonhentos (FUNED), foi fracionada por cromatografia de exclusão molecular (Superose 12). As frações obtidas foram caracterizadas quimicamente, por SDS-PAGE e por espectrometria de massas (MALDI-TOF), e biologicamente, apresentando atividades fosfolipásica A2, hialuronidásica, hemaglutinante e antimicrobiana, além de induzir perda de adesão celular de adenocarcinoma de mama, em cultura. Com o objetivo de purificar o componente antimicrobiano de *M. lemniscatus* (MI-AM), a fração obtida por exclusão molecular (EM-F1) foi submetida à cromatografia de troca aniônica (SynChropack AX 300). MI-AM apresentou CIM/CBM de 1,58 µg/mL contra *S. aureus* (ATCC® 6538™), pouca toxicidade contra hepatócitos, fibroblastos e células renais humanas e não induziu lise em lipossomos. A massa molecular de MI-AM, após cromatografia de fase reversa analítica (Vydac C4), foi de aproximadamente 69 kDa (identificada por SDS-PAGE e espectrometria de massas MALDI-TOF). Além disso, o estudo de *cross linking* mostrou que MI-AM forma oligômeros em condições nativas. MI-AM foi identificado como uma L-aminoácido oxidase (após análise por MALDI-TOF-TOF MS/MS), sendo, então, denominado MI-LAAO.

8. PERSPECTIVAS

- Explorar os componentes responsáveis pelas atividades fosfolipásica A2, hialuronidásica, hemaglutinante e de perda de adesão celular de adenocarcinoma de mama em cultura;
- Avaliar a atividade enzimática de MI-LAAO;
- Compreender o mecanismo de ação de MI-LAAO, sobre bactérias;
- Avaliar a atividade antimicrobiana de MI-LAAO em outras cepas bacterianas, assim como em fungos.

9. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- ABDELKAFI-KOUBAA, Z.; JEBALI, J.; OTHMAN, H.; MORJEN, M.; AISSA, I.; ZOUARI-KESENTINI, R.; BAZAA, A.; ELLEFI, A.A.; MAJDOUB, H.; SRAIRI-ABID, N.; GARGOURI, Y.; EL AYEB, M.; MARRAKCHI, N. **A Thermoactive L-amino acid oxidase From *Cerastes* Snake Venom: Purification, Biochemical And Molecular Characterization.** *Toxicon*, 89: 32-44, 2014.
- AIRD, S. D.; DA SILVA JR., N. J. **Comparative Enzymatic Composition Of Brazilian Coral Snake (*Micrurus*) Venoms.** *Comparative Biochemistry and Physiology*, 99: 287-294, 1991.
- ALAPE-GIRON, A.; LOMONTE, B.; GUSTAFSSON, B.; DA SILVA, N.J.; THELESTAM, M. **Electrophoretic And Immunochemical Studies Of *Micrurus* Snake Venoms.** *Toxicon*, 32: 713-723, 1994.
- BARROS, A. C. S.; FERNANDES, D.P.; FERREIRA, L.C.; DOS SANTOS, M.C. **Local Effects Induced By Venoms From Five Species Of Genus *Micrurus* Sp. (Coral Snakes).** *Toxicon*, 32 : 445-52, 1994.
- BERNARDE, P. **Corais (Falsas & Verdadeiras) Do Brasil;** www.herpetofauna.com.br/Corais.htm; acesso em 24/08/2015.
- BRAHMA, R. K.; MCCLEARY, R. J. R., KINI, M., DOLEY, R. **Venom Gland Transcriptomics For Identifying, Cataloging, And Characterizing Venom Proteins In Snakes.** *Toxicon*, 93: 1–10, 2015.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Vigilância em Saúde. Departamento de vigilância E. Guia de Vigilância epidemiológica. Brasília. p 103-108, 2014.
- BURK, A.S.; MONZEL, C.; YOSHIKAWA, H.Y.; WUCHTER, P.; SAFFRICH, R.; ECKSTEIN, V.; TANAKA, M.; HO, A.D. **Quantifying Adhesion Mechanisms and Dynamics of Human Hematopoietic Stem and Progenitor Cells.** *Scientific Reports*, 5, 9370, 2014.

- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; ÂNGULO, Y.; LOMONTE, B.; MARIA GUTIERREZ, J. **Venoms, Venomics, Antivenomics.** Febs Letters 583: 1736-1743, 2009.
- CALVETE, J. J.; SANZ, L.; PEREZ, A.; BORGES, A.; VARGAS, A. M., *et al.* **Snake Populations Venomics And Antivenomics Of *Bothrops atrox*: Paedomorphism Along Its Transamazonian Dispersal And Implications Of Geographic Venom Variability On Snakebite Management.** Journal of Proteomics 74: 510-527, 2011.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere.** Cornell University Press, Ithaca, 2004.
- CASEWELL, N.R.; HARRISON, R.A.; WÜSTER, W.; WAGSTAFF, S.C. **Comparative Venom Gland Transcriptome Surveys Of The Saw-Scaled Vipers (Viperidae: Echis) Reveal Substantial Intra-Family Gene Diversity And Novel Venom Transcripts.** BMC Genomics, 30, 10: 564, 2009.
- CAVALLARO, U.; CHRISTOFORI, G. **Multitasking In Tumor Progression: Signaling Functions Of Cell Adhesion Molecules.** Ann N Y Acad Sci, 1014: 58-66, 2004.
- CECCHINI, A. L. *et al.* **Biological And Enzymatic Activities Of *Micruru* Ssp. (Coral) Snake Venoms.** Comparative Biochemistry and Physiology. Part A.140:125-134, 2005.
- CHIPPAUX, J. P., WILLIAMS, V.; WHITE, J. **Snake Venom Variability: Methods Of Study, Results And Interpretation.** Toxicol. 29: 1279-1303, 1991.
- CHIPPAUX, J.-P. **Estimating the Global Burden of Snakebite Can Help To Improve Management.** Plos Medicine 5: 1538-1539, 2008.
- CHIPPAUX, J.P. **Epidemiology Of Envenomations By Terrestrial Venomous Animals In Brazil Based On Case Reporting: From Obvious Facts To Contingencies.** Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases: 21: 13, 2015.

- CISCOTTO, P. H. C. *et al.* **Venomic Analysis And Evaluation Of Antivenom Cross-Reactivity 2 Of South American *Micrurus* Species.** Journal of Proteomics, 74: 1810-1825, 2011.
- COSTA, H.C.; BÉRNILES, R.S. **Répteis brasileiros: Lista de espécies.** In: Herpetologia Brasileira, volume 3, 2014.
- COSTA, T.R.; MENALDO, D.L.; DA SILVA, C.P.; SORRECHIA, R.; DE ALBUQUERQUE, S.; PIETRO, R.C.L.R.; GHISLA, S.; ANTUNES, L.M.G.; SAMPAIO, S.V. **Evaluating The Microbicidal, Antiparasitic And Antitumor Effects Of CR-LAAO From *Calloselasma rhodostoma* Venom.** International Journal of Biological Macromolecules, 80: 489-497, 2015.
- DA SILVA JR, N. J.; SITES JR, J. W. **Phylogeny Of South American Triad Coral Snakes (Elapidae: *Micrurus*) Basedon Molecular Characters.** Herpetologica. 57: 1-22, 200.
- DA SILVA JR, N.J.; GRIFFIN, P.R.; AIRD, S.D. **Comparative Chromatography of Brazilian Coral Snake (*Micrurus*) Venoms.** Comparative Biochemistry and Physiology. 100: 117-126, 1991.
- DA SILVA, S.L.; ROWAN, E.G.; ALBERICIO, F.; STÁBEL, R.G.; CALDERON, L.A.; SOARES, A.M. **Editorial: Animal Toxins and Their Advantages in Biotechnology and Pharmacology.** BioMed Research International, 2014: 1-2, 2014.
- DOKMETJIAN, J. C.; DEL CANTO, S.; VINZON, S.; DE JIMENEZ BONINO, M. B. **Biochemical Characterization Of The *Micrurus pyrrhocryptus* Venom.** Toxicon, 53: 375-382, 2009.
- DOLEY, R.; ZHOU, X.; KINI, R.M. **Snake Venom Phospholipase A₂ Enzymes.** In: Mackessy, SP, editors. Handbook of venom and toxins of reptiles. P. 173-206, 2010.
- DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. **Snake venom L-amino acid oxidases.** Toxicon, 40: 659-665, 2002.

- EARL, S.T.; ROBSON, J.; TRABI, M.; DE JERSEY, J.; MASCI, P.P.; LAVIN, M.F. **Characterization Of A Monnose-Binding C-Type Lectin From *Oxyuranus scutellatus* Snake Venom.** *Biochimie*, 93: 519-527, 2011.
- FERNANDEZ, J.; ALAPE-GIRON, A.; ÂNGULO, Y.; SANZ, L.; GUTIERREZ, J. M., CALVETE, J. J., *et al.* **Venomic And Antivenomic Analyses Of The Central American Coral Snake, *Micrurus nigrocinctus* (Elapidae).** *J Proteom Res.*, 10: 1816–1827, 2011.
- FRY, B. G.; ROELANTS, K.; CHAMPAGNE, D. E.; SCHEIB, H.; TYNDALL, J. D. A., *et al.* **The Toxicogenomic Multiverse: Convergent Recruitment of Proteins Into Animal Venoms.** *Annual Review of Genomics and Human Genetics* 10: 483-511, 2009.
- FRY, B. G.; SCHEIB, H.; VAN DER WEERD, L.; YOUNG, B.; MCNAUGHTAN, J., *et al.* **Evolution Of An Arsenal Structural And Functional Diversification Of The Venom System In The Advanced Snakes (Caenophidia).** *Molecular & Cellular Proteomics* 7: 215-246, 2008.
- FRY, B.G.; CASEWELL, N.R.; WUESTER, W.; VIDAL, N.; YOUNG, B. **The Structural And Functional Diversification Of The Toxicofera Reptile Venom System.** *Toxicon*, 60: 434-448, 2012.
- GIRAUDO, A. R.; SCROCCHI, G. J. **Argentinian Snakes: An Annotated Checklist.** *Smithsonian Herpetology. Serv. Ser.* 132: 1-53, 2002.
- GIRISH, K. S.; JAGADEESHA, D. K.; RAJEEV, K. B.; KEMPARAJU, K. **Snake Venom Hyaluronidase: An Evidence For Isoforms And Extracellular Matrix Degradation.** *Mol Cell Biochem* 240: 105-110, 2002.
- GOUVEIA, A.I.D. **Identification and Partial Characterization Of Hyaluronidases In *Lonomia Obliqua* Venom.** *Toxicon*, 45: 403-410, 2005.
- GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B.; PORTILLA, E.; CERDAS, L.; ROJAS, E. **Local Effects Induced By Coral Snake Venoms: Evidence Of Myonecrosis After Experimental Inoculations Of Venoms From Five Species.** *Toxicon*, 21: 777-784, 1983.

- GUTIÉRREZ, J.M.; THEAKSTON, R.D.G.; WARRELL, D.A. **Confronting The Neglected Problem Of Snake Bite Envenoming: The Need For A Global Partnership.** Plos Medicine, 3: 727-731, 2006.
- HABERMAN, E.; HARDT, K.L. **A Sensitive And Specific Plate Test For The Quantitation Of Phospholipases.** Anal Biochem, 50:163-173, 1972.
- HANANE-FADILA, Z.M.; FATIMA, L.D. **Purification, Characterization And Antibacterial Activity Of L-amino acid oxidase From Cerastes cerastes.** J. Biochem Mol Toxicol, 28: 347-354, 2014.
- HARRISON, R.A.; COOK, D.A.; RENJIFO, C.; CASEWELL, N.R.; CURRIER, R.B. *et al.* **Research Strategies To Improve Snakebite Treatment: Challenges And Progress.** Journal of Proteomics, 74: 1768-1780, 2011.
- HEDGE, R.P.; RAJAGOPALAN, N.; DOLEY, R.; KINI, R.M. **Snake Venom Three-Finger Toxins.** In: Mackessy, SP, editors. Handbook of venom and toxins of reptiles. P. 287-302, 2010.
- KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M.T.; SINHÁ, M.; KUMAR, R.P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R.M. **Enzymatic Toxins From Snake Venom: Structural Characterization And Mechanism Of Catalysis.** FEBS J. 278: 4544-4576, 2011.
- KASTURIRATNE, A.; WICKREMASINGHE, A.R.; DE SILVA, N.; GUNAWARDENA, N.K.; PATHMESWARAN, A., *et al.* **The Global Burden Of Snakebite: A Literature Analysis And Modelling Based On Regional Estimates Of Envenoming And Deaths.** Plos Medicine 5: 1591-1604, 2008.
- KOMORI, Y.; NIKAI, T.; TOHKAI, T.; SUGIHARA, H. **Primary Structure And Biological Activity Of Snake Venom Lectin (APL) From *Agkistrodon p. piscivorus* (Eastern cottonmouth).** Toxicon, 37: 1053-1064, 1999.

- KUNER, R.; MULEY, T.; MEISTER, M.; RUSCHHAUPT, M.; BUNESS, A.; XU, E.C.; SCHNABEL, P.; WARTH, A.; POUSTKA, A.; SULTMANN, H.; HOFFMANN, H. **Global Gene Expression Analysis Reveals Specific Patterns Of Cell Junctions In Non-Small Cell Lung Cancer Subtypes.** Lung Cancer, 63: 32-38, 2008.
- LAEMMLI, U. K. **Cleavage Of Structural Proteins During The Assembly Of The Head Of Bacteriophage T4.** Nature, 277: 680-689, 1970.
- LEÃO, L.I.; HO, P.L.; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, Ide. L. **Transcriptomic Basis For An Antiserum Against *Micrurus corallinus* (Coral Snake) Venom.** BMC Genomics, 10:112, 2009.
- MACKESSY, S.P. **The Field of Reptile Toxinology - Snakes, Lizards, and Their Venoms.** In: Mackessy, SP, editors. Handbook of venom and toxins of reptiles. P.13-14, 2010.
- MAKRILIA, N.; KOLLIAS, A.; MANOLOPOULOS, L.; SYRIGOS, K. **Cell Adhesion Molecules: Role and Clinical Significance in Cancer.** Cancer Investigation, 27: 1023-1037, 2009.
- MANOCK S. R.; SUAREZ G.; GRAHAM D.; AVILA-AGUERO M. L.; *et al.* **Neurotoxicenvenoming by South American Coral Snake (*Micrurus lemniscatus helleri*): Casereport From Eastern Ecuador And Review.** Trans R Soc Trop Med Hyg, 102: 519–527, 2008.
- MELGAREJO, A. R. **Serpentes Peçonhentas Do Brasil. Animais Peçonhentos No Brasil: Biologia, Clínica E Terapêutica Dos Acidentes.** SARVIER: São Paulo, 1: 33-61, 2003.
- OGILVIE, M. L.; BYL, J. W. & GARTNER, T. K. **Platelet-Aggregation Is Stimulated By Lactose-Inhibitable Snake Venom Lectins.** Thromb Haemost 62: 704-707, 1989.
- OGILVIE, M.L.; DOCKTER, M.E.; WENZ, L.; GARTNER, T.K. **Isolation And Characterization Of Lactose-Binding Lectins From The Venoms Of The Snakes *Lachesis muta* and *Dendroaspis jamesonii*.** J. Biochem, 100: 1425-1431, 1986.

- OLAMENDI-PORTUGAL, T.; BATISTA C. V.; RESTANO-CASSULINI, R.; PANDO, V.; VILLA HERNANDEZ, O.; ZAVALETA-MARTINEZ-VARGAS, A., *et al.* **Proteomic Analysis Of The Venom From The Fish Eating Coral Snake *Micrurus surinamensis*: Novel Toxins, Their Function And Phylogeny.** *Proteomics* 8: 1919–1932, 2008.
- OLIVEIRA JR, N.G.; CARDOSO, M.H.; FRANCO, O.L. **Snake Venoms: Attractive Antimicrobial Proteinaceous Compounds For Therapeutic Purposes.** *Cellular and Molecular Life Sciences*, 70: 4645-4658, 2013.
- OLIVEIRA, D.A.; HARASAWA, C.; SEIBERT, C.S.; CASAIS E SILVA, L.L.; PIMENTA, D.C.; LEBRUN, I.; SANDOVAL, M.R.L. **Phospholipases A2 Isolated from *Micrurus lemniscatus* Coral Snake Venom: Behavioral, Electroencephalographic, And Neuropathological Aspects.** *Brain Research Bulletin*, Elsevier 75: 629–639, 2008.
- OMS. **Venomous Snakes Distribution And Species Risk Categories;** <http://apps.who.int/bloodproducts/snakeantivenoms/database/>; 2010.
- OTERO-PATINO, R. **Epidemiological, Clinical And Therapeutic Aspects Of *Bothrops asper* Bites.** *Toxicon* 54: 998-1011, 2009.
- PELGRIFT, R.Y.; FRIEDMAN, A.J. **Nanotechnology As A Therapeutic Tool To Combat Microbial Resistance.** *Adv. Drug Deliv Rev.* 65: 1803-1815, 2013.
- PHUA, C.S.; VEJAYAN, J.; AMBU, S.; PONNUDURAI, G.; GORAJANA, A. **Purification And Antibacterial Activities Of An L-amino acid oxidase From King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom.** *The Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, 18: 198-207, 2012.
- PYRON, R.A.; BURBRINK, F.T.; WIENS J.J. **A Phylogeny And Revised Classification Of Squamata, Including 4161 Species Of Lizards And Snakes.** *Bmc Evolutionary Biology* 13, 2013.

- PYRON, R.A.; BURBRINK, F.T.; COLLI, G.R.; DE OCA, A.N.; VITT, L.J.; KUCZYNSKI, C.A.; WIENS, J.J. **The Phylogeny of Advanced Snakes (Coubroidea), with Discovery of a New Subfamily and Comparison of Support Methods for Likelihood trees.** Mol Phylogenet Evol, 58: 329-342, 2011.
- RODRIGUES, R.S.; DA SILVA, J.F.; FRANÇA, J.B.; FONSECA, F.P.P.; OTAVIANO, A.R.; SILVA, F.H.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A.J.; BRAZ, A.S.K.; DOS SANTOS, J.I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; FONTES, M.R.M; FULY, A.L.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. **Structural And Functional Properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase Isolated From *Bothrops Pauloensis* Snake Venom.** Biochimie 91: 490–501, 2009.
- SAMEL, M.; NISMÄGI, K.T.; RÖNNHOLM, G.; VIJA, H.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. **L-amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom.** Comparative Biochemistry and Physiology, Part B 149: 572–580, 2008.
- SANTORO, M.L.; SOUSA-E-SILVA, M.C.; GONÇALVES, L.R.; ALMEIDA-SANTOS, S.M.; CARDOSO, D.F.; LAPORTA-FERREIRA, I.L.; SAIKI, M.; PERES, C.A.; SANO-MARTINS, I.S. **Comparison Of The Biological Activities In Venoms From Three Subspecies Of The South American Rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*, *C. durissus cascavella* and *C. durissus collilineatus*).** Comp. Biochem. Physiol. C. Pharmacol. Toxicol. Endocrinol., 122: 61-73, 1999.
- SAZIMA, I.; ABE, A. S. **Habits Of Five Brazilian Snakes With Coral-Snake Pattern Including A Summary Of Defensive Tactics.** Studies on Neotropical Fauna and Environment. 26: 159-164, 1991.
- SILVA, J. R. N.; BUCARETCHI, F. **Mecanismo De Ação Do Veneno Elapídico E Aspectos Clínicos Dos Acidentes.** In: CARDOSO, J.L.C.; FRANÇA, F.O.S.; FAN, H.W.; MÁLAQUE, C.M.S.; HADDAD JR, V. Animais peçonhentos no Brasil. Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes. São Paulo: Sarvier; p. 99-107, 2003.

- STÁBELI, R.G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.L.R.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. **Platelet Aggregation And Antibacterial Effects Of An L-amino acid oxidase Purified from *Bothrops alternatus* Snake Venom**. *Bioorg Med Chem*, 12: 2881-2886, 2004.
- STÁBELI, R.G.; SANT'ANA, C.D.; RIBEIRO, P.H.; COSTA, T.R.; TICLI, F.K.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; ALGUQUERQUE, S.; MALTA-NETO, N.R.; MARINS, M.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M. **Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: Biochemical And Functional Characterization**. *Int. J. Biol. Macromol.*, 41: 132-140, 2007.
- TAN, N. H.; PONNUDRAI, G. **The Biological Properties Of Venoms Of Some American Coral Snakes (genus *Micrurus*)**. *Comp BiochemPhysiol Part B: Comp Biochem* 101: 471-474, 1992.
- TAN, N.H.; FUNG, S.Y. **Snake Venom L-amino acid oxidases And Their Potential Biomedical Applications**. *Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology*, 16: 1-10, 2008.
- TANAKA, G. D. *et al.* **Diversity of *Micrurus* Snake Species Related To Their Venom Toxic Effects And The Prospective Of Antivenom Neutralization**. *Neglected tropical diseases*, 4: e622, 2010.
- TASHIMA, A. K.; ZELANIS, A.; KITANO, E. S.; IANZER, D.; MELO, R. L.; RIOLI, V.; SANT'ANNA, S. S.; SCHENBERG, A. C.; CAMARGO, A. C.; SERRANO, S. M. **Peptidomics of Three *Bothrops* Snake Venoms: Insights Into The Molecular Diversification Of Proteomes And Peptidomes**. *Mol Cell Proteomics* 11: 1245–1262, 2012.
- TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D.O.; PASSERO, L.F.D.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.S.; MARTINS, M.A.C.; MONTEIRO, H.S.A.; FONTELES, M.C. **Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom**. *Toxicon* 47: 47-57, 2006.
- UETZ, P. **The Reptile Database**, 2013.

- VIDAL, N. **Colubroid Systematics: Evidence For An Early Appearance Of The Venom Apparatus Followed By Extensive Evolutionary Tinkering.** Journal of Toxicology-Toxin Reviews 21: 21-41, 2002.
- VIDAL, N.; HEDGES, S.B. **The Phylogeny Of Squamate Reptiles (Lizards, Snakes And Amphisbaenians) Inferred From Nine Nuclear Protein-Coding Genes.** Comptes Rendus Biologies, 328: 1000-1008, 2005.
- VITAL BRAZIL, O. **Coral Snake Venoms: Mode of Action and Pathophysiology of Experimental Envenomation.** Revista do Instituto de Medicina Tropical. 29: 119-26, 1987.
- VITAL BRAZIL, O. **Pharmacology of coral snake venoms.** Mem Inst Butantan 52: 32, 1990.
- WALDEZ, F.; VOGT, R. C. **Aspectos ecológicos e epidemiológicos de acidentes ofídicos em comunidades ribeirinhas do baixo rio.** 39: 681-692, 2009.
- WHO: **Antimicrobial resistance: global report on surveillance.** 2014, 257p.
- WILLIAMS, D.; GUTIÉRREZ, J.M.; HARRISON, R.; WARREL, D.A.; WHITE, J. **The Global Snake Bite Initiative: an antidote for snake bite.** Lancet 375: 89-91, 2010.
- XIN, M.; DONG, X.W.; GUO, X.L. **Role of the interaction between galectin-3 and cell adhesion molecules in cancer metastasis.** Biomed Pharmacother. 69: 179-185, 2015.
- ZHA, H.G.; LEE, W.H.; ZHANG, Y. **Cloning of cDNA encoding C-type lectins from Elapidae snakes *Bungarus fasciatus* and *Bungarus multicinctus*.** Toxicon, 39, 1887-1892, 2001.
- ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q.; DONG, Y.; LIU, P. **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 Crystallography D Biol. Crystallography, 60: 974-977, 2004.

ZHANG, H.; YANG, Q.; SUN, M.; TENG, M.; NIU, L. **Hydrogen peroxide produced by two amino acid oxidases mediates antibacterial actions.** J Microbiol, 42: 336-339, 2004.