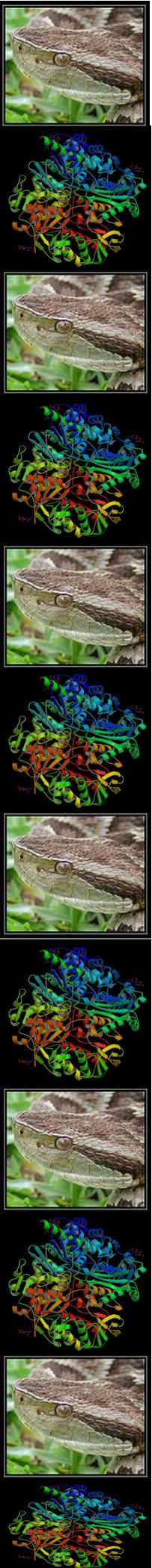


PAULA HENRIQUES CRUZ CISCOTTO

Purificação e caracterização biológica (estrutural, antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de componentes do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS-BRASIL
2005



PAULA HENRIQUES CRUZ CISCOTTO

Purificação e caracterização biológica (estrutural, antibacteriana, antiparasitária, hemolítica e antigênica) de componentes do veneno da serpente *Bothrops jararaca*.

Dissertação submetida ao Curso de Pós-graduação em Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do título de mestre em Bioquímica e Imunologia.

Orientador: Prof. Dr. Carlos Chávez Olórtegui

BELO HORIZONTE
MINAS GERAIS-BRASIL

2005

Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Imunoquímica de Toxinas, do Departamento de Bioquímica e Imunologia do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais. Contando com a colaboração do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, do Departamento de Microbiologia, do Laboratório de Enzimologia e Físico-Química de Proteínas, do Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, ambos do Departamento de Bioquímica e Imunologia, todos do Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais.

Agradecimentos

Aos meus pais por sempre estarem ao meu lado, incentivando meu crescimento pessoal e profissional, e apoiando minhas decisões.

Ao Luiz pelo carinho constante e incentivo permanente, por sua tolerância em momentos delicados. Graças à suas palavras de perseverança e otimismo consegui chegar ao final desta caminhada.

Ao Prof. Carlos Chávez Olórtegui por me incentivar a começar esta trajetória científica pelo caminho da especialização profissional e por depositar em mim sua confiança para realização deste trabalho.

Ao Jamil por seus ensinamentos, incentivo e por estar sempre disponível a me ajudar. Agradeço a sua amizade, você me estendeu a mão quando precisei ser erguida, me escutou quando precisei desabafar e me deu conselhos e apoio durante toda esta trajetória.

Ao Prof. Adriano Pimenta pelo auxílio na determinação da massa molecular, e por estar sempre disponível para passar os seus ensinamentos.

Ao Prof. Marcelo Matos Santoro pelos importantes conselhos, pela ajuda na análise de dados, e por abrir as portas do seu laboratório.

Ao Prof. Marcelo Bemquerer pela ajuda na determinação da seqüência de aminoácidos.

Aos pesquisadores Eládio Sanchez, Michael Richardson e ao Prof. Tomáz por seus conhecimentos convertidos em auxílio durante o trabalho.

À Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho, ao Prof. Luiz de Macedo Farias e ao Prof. Cláudio Galupo Diniz pelo auxílio nos experimentos de atividade antibacteriana e hemolítica. Agradeço a todos do Laboratório de Microbiologia Oral e de Anaeróbios.

Ao Dr. Eduardo Ferraz Coelho pelo auxílio nos experimentos com *Leishmania*, e também pela constante companhia no nosso laboratório.

A todos os colegas do Laboratório de Enzimologia e Físico-química de Proteínas, que me acolheram com carinho e muita prestatividade, em especial ao André, Alexandre, Jaque, Janete, Lu, Marcos que me proporcionaram momentos agradáveis.

A todos os colegas do Laboratório de Imunologia e Biologia Celular de Parasitas por suas disponibilidades a ajudar, em especial ao Fabiano, Vinício e Wanderson.

As sempre companheiras de FUNED, Inácia, Nelman, e Roberta que mesmo um pouco mais distante estão ao meu lado com palavras de incentivo.

A todos da turma de Bases que se mostraram pessoas maravilhosas. Fomos privilegiados com a união desta turma que permaneceu ao longo do mestrado.

A todos colegas e ex-colegas de laboratório, Adriana, Christina, Kádima, Francisca, Juliana, Larissa, Liza, Mário, Paula, Priscila, Rodrigo, Ricardo, Kênia, Rafa, e Carol que durante estes dois anos ou parte dele, fizeram parte do meu dia-dia, contribuindo com suas experiências e incentivos. Agradeço a todos vocês pelos dias de alegria e também de dificuldade que passamos juntos, o que sempre nos leva a um crescimento pessoal. Na vida, além do conhecimento adquirido, o mais interessante é a relação interpessoal, no qual conhecemos pessoas que permanecerão em nosso coração ou em nossa lembrança. Vocês sempre estarão comigo.

Índice

Lista de Figuras	vii
Lista de Tabelas	viii
Lista de Abreviaturas	ix
Resumo	xi
Abstract.....	xiii
1 – INTRODUÇÃO	1
1.1 – Aspectos gerais.....	2
1.2 – As serpentes.....	3
1.3 – O veneno	4
1.4 – <i>Bothrops jararaca</i>.....	6
1.5 – L-aminoácido oxidase (LAO).....	8
1.6 – Proteínas tipo-lectina tipo-C.....	10
1.7 – Aplicações biotecnológicas dos venenos ofídicos.....	12
1.8 – Soroterapia	13
2 – OBJETIVOS.....	15
2.1 – Objetivo geral.....	16
2.2 – Objetivos específicos.....	16
3 – MATERIAIS E MÉTODOS	17
3.1 – Venenos	18
3.2 – Reagentes	18
3.3 – Dosagem de proteínas	18
3.4 – Atividade antibacteriana	19
3.4.1 – Ensaio por difusão em agar	19
3.4.2 – Escolha do veneno	19
3.4.3 – Sensibilidade de bactérias frente ao veneno botrópico.....	20
3.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	21
3.6 – Ensaio de atividade L-aminoácido oxidase (LAO).....	22
3.7 – Fracionamento do veneno bruto de <i>B. jararaca</i>	23
3.7.1 – Cromatografia por gel filtração em sistema de FPLC	23
3.7.2 – Cromatografia por troca aniônica em sistema FPLC	24

3.7.3 – Cromatografia por afinidade a heparina em sistema FPLC	24
3.7.4 – Cromatografia de fase reversa em HPLC	25
3.8 – Espectrometria de massa	25
3.9 – Determinação da estrutura primária de proteínas.....	26
3.9.1 – Processo de redução e alquilação.....	26
3.10 – Atividade antiparasitária	26
3.10.1 – Ensaio de viabilidade pela oxidação do MTT.....	27
3.11 – Atividade hemolítica.....	28
3.12 – Diferenciação da potência de antivenenos botrópicos.....	29
4 – RESULTADOS.....	30
4.1 – Escolha do veneno.....	31
4.2 – Sensibilidade das bactérias frente aos venenos botrópicos	33
4.3 – Purificação do veneno de <i>B. jararaca</i>.....	35
4.3.1 – Cromatografia de gel filtração.....	35
4.3.2 – Cromatografia de troca iônica.....	39
4.3.3 – Cromatografia de afinidade por heparina.....	42
4.4 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE.....	45
4.5 – Atividade antiparasitária e hemolítica	46
4.6 – Atividade específica por diferentes substratos	49
4.7 – Caracterização bioquímica e biológica da proteína P8 purificada na cromatografia de troca aniônica	52
4.7.1 – Perfil protéico em SDS-PAGE da proteína P8.....	52
4.7.2 – Cromatografia de fase reversa da proteína P8	53
4.7.3 – Análise por espectrometria de massa, redução e sequenciamento da proteína P8	54
4.7.4 – ELISA: determinação da potência de antivenenos	58
5 – DISCUSSÃO	60
6 – CONCLUSÕES	72
7 – PERSPECTIVAS.....	74
8 – REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76

Lista de Figuras

Figura 1: Foto *B. jararaca*

Figura 2: L-aminoácido oxidase da serpente *Callosema rhodostoma*

Figura 3: Inibição do crescimento de *S. aureus* frente a diferentes venenos

Figura 4: Perfil da cromatografia de gel filtração em coluna Superdex™75 HR10/30 em sistema de FPLC

Figura 5: Ensaio de atividade antibacteriana das frações da cromatografia de gel filtração

Figura 6: Ensaio da atividade L-aminoácido oxidase das frações da cromatografia de gel filtração.

Figura 7: Perfil da cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q em sistema de FPLC

Figura 8: Ensaio de atividade antibacteriana das frações da troca aniônica.

Figura 9: Perfil da cromatografia de afinidade a heparina na coluna HiTrap Heparin em sistema de FPLC

Figura 10: Ensaio da atividade antibacteriana da fração purificada na cromatografia de afinidade a heparina.

Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do veneno bruto de *B. jararaca* e das frações dos processos cromatográficos

Figura 12: Caracterização da atividade antiparasitária contra *L. l. amazonensis*

Figura 13: Ensaio hemolítico em células de cavalo

Figura 14: Atividade L-aminoácido oxidase da fração HTP1 sobre diferentes substratos.

Figura 15: Gel de poliacrilamida com SDS da proteína P8 purificada

Figura 16: Perfil da cromatografia da proteína P8 (Fig. 4) em fase reversa (HPLC)

Figura 17: Espectrometria de massa da proteína P8.

Figura 18: Perfil cromatográfico em fase reversa da proteína P8, após redução e alquilação

Figura 19: Correlação entre os níveis de anticorpos medidos por ELISA e as potências neutralizante de antivenenos botrópicos.

Lista de Tabelas

Tabela 1: Sensibilidade de bactérias gram-positivas e gram-negativas frente ao veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*

Tabela 2: Purificação da fração com atividade antibacteriana e L-aminoácido oxidase.

Tabela 3: Cálculo da atividade específica da fração HTP1

Tabela 4: Comparação da seqüência de aminoácidos da região N-terminal das subunidades P8a e P8b com outras proteínas

Tabela 5: Comparação entre a massa média observada da proteína P8 e as massas médias calculada e observada da botrocetina

Lista de Abreviaturas

BHI	<i>Brain heart infusion</i>
BSA	Albumina de soro bovina
C	Cisteína
D	Aspartato
Da	Daltons
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagle's Medium</i>
E	Ácido glutâmico
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
Es-Q-TOF	Eleto-spray quadrupole time-of-flight
F	Fenilalanina
FAD	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN	Flavina mononucleotídeo
FPLC	<i>Fast Performance Liquid Chromatography</i>
G	Glicina
GPIb	Glicoproteína Ib
H	Histidina
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt Solution</i>
H₂O₂	Peróxido de hidrogênio
HPLC	<i>High Pressure Liquid Chromatography</i>
HTP1	Fração da cromatografia de afinidade a heparina
K	Lisina
KDa	Kilodaldons
L	Leucina
LAO	L-aminoácido oxidase
mg	Miligramas
min	Minutos
mL	Mililitros

MTT	3-[4,5-dimetiltiazol-2-1]-2,5difenil-tetrazoliobrometo
N	Asparagina
NH₃	Amônia
OPD	Ortofenilenodiamino
P	Prolina
P1	Fração P1 da cromatografia de gel filtração
PAGE	<i>Polyacrylamide gel electrophoresis</i>
pH	Potencial hidrogênio
PSA	Persulfato de Amônia
Q	Glutamina
R	Arginina
ROS	Espécie reativa do oxigênio
S	Serina
SDS	Dodecilsulfato de sódio
TAP5/6	Frações 5 e 6 da cromatografia de troca aniônica
TEMED	N,M,N',N-tetrametilenodiamina
TFA	Ácido trifluoracético
TRIS	Tris(Hidroximetil)aminometano
TSA	<i>Tryptic Soy Agar</i>
V	Valina
vWF	Fator de von Willerbrand
W	Triptofano
Y	Tirosina
µg	Micrograma
µL	Microlitros

Resumo

Os venenos de animais peçonhentos constituem rica fonte de informação para os pesquisadores, por serem compostos de substâncias biologicamente ativas. Dentre essas substâncias destacam-se as proteínas e os peptídeos que, ao serem caracterizados, possibilitam o seu entendimento funcional, além de promover uma possível aplicabilidade biotecnológica.

O presente trabalho teve início após a observação que entre diferentes venenos de animais peçonhentos testados quanto à capacidade antibacteriana, os das serpentes do gênero *Bothrops* apresentaram significativa atividade, principalmente *B. jararaca*. O veneno de *B. jararaca* mostrou-se capaz de inibir o crescimento de bactérias gram-positivas e gram-negativas, sendo então fracionado pela combinação sucessiva das cromatografias de gel filtração, troca aniônica e afinidade à heparina, obtendo-se ao final dos processos uma fração com atividade antibacteriana. A atividade antibacteriana está diretamente ligada a atividade L-aminoácido oxidase. A fração purificada HTP1 e o veneno bruto apresentaram também atividade antiparasitária, matando formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* e atividade hemolítica, promovendo a lise parcial de hemácias de cavalo. As atividades biológicas de HTP1 foram inibidas pela adição de catalase, um antioxidante, o que leva a sugerir a ligação direta do peróxido de hidrogênio nestas atividades.

Após cromatografia de troca aniônica foi purificada uma proteína heterodimérica, denominada proteína P8 com massa molecular de 30260,87 Da observada por espectrômetro de massa. Após redução das ligações dissulfetos esta apresentou duas subunidades com 15,8 kDa e 14,4 kDa. A seqüência de aminoácidos da região N-terminal da subunidade P8a foi DCPGWSSYEGNCYKFFQQK, e da subunidade P8b foi

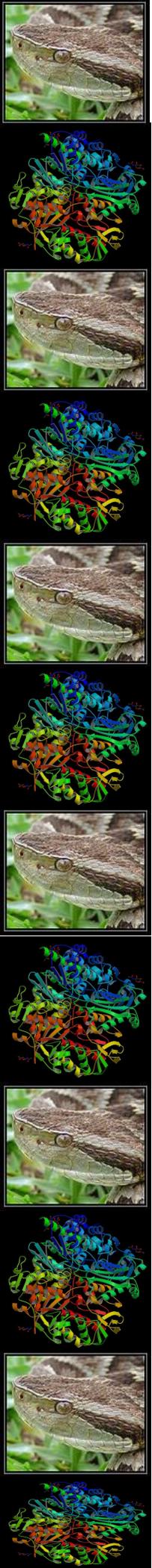
XCPPDWSSYEGHCYRFFKEE. As subunidades da proteína P8 apresentaram alto grau de identidade com proteínas tipo-lectina tipo-C. A atividade antigênica da proteína P8 foi caracterizada e foi observado que a potência de antivenenos botrópicos se correlacionou com títulos de anticorpos medidos por ELISA, quando esta proteína foi imobilizada nas placas.

Abstract

Snake venoms contain many proteinaceous components which incapacitate and digest prey. Neurotoxins, cytotoxins, myotoxins, proteases and nucleases are found in varying quantities in snake venoms. The biochemical characterization of these compounds would facilitate the study of their functions and give a clue of their applicability in biotechnology.

Venoms from 13 different animal species were tested using agar diffusion assay for antibacterial effects against *Staphylococcus aureus*. The venoms from five species of *Bothrops* showed strong antibacterial effects, mainly *Bothrops jararaca* venom. The crude venom from *B. jararaca* displayed antibacterial activity against various gram-negative and gram-positive bacteria. Purification of active fractions from crude venom was performed by molecular size-exclusion, ion exchange and heparin affinity chromatography. The crude venom and purified fraction (HTP1) presented a killing effect *in vitro* against promastigote forms of *Leishmania amazonensis* and hemolytic effect in horse blood agar. Antibacterial, anti-Leishmania and hemolytic activities correlated with L- amino acid oxidase and were terminated by catalase addition. The oxidation activity of HTP1 was characterized for substrate specificity through analysis of various amino acids as substrates, with high oxidase activity against L-leucina and L-metionina.

The botrocetin-like protein (P8 protein) was purified after ion exchange chromatography. The apparent molecular mass of the protein P8 was 29,5 kDa before and 15,8 kDa and 14,4 kDa after reduction. The observed molecular mass, obtained by mass spectrometry, was 30,260.87 Da. The observed amino acid sequence for the two peptide chains were DCPSGWSSYEGNCYKFFQK (P8a) and XCPPDWSSYEGHCYRFFKEE (P8b). These two chain sequences displayed high degree of similarity with C-type lectin-like protein. An assay based on enzyme-linked immunosorbent assay (ELISA) was developed to test the potency of anti-*Bothrops* antivenoms, using P8 protein.



1 – Introdução

1.1 – Aspectos gerais

Os acidentes ofídicos apresentam considerável importância médica em virtude da sua grande frequência e gravidade. Entre os anos de 1990 e 1993, 20 mil casos de acidentes foram notificados no Brasil, com cerca de 90 mortes por ano (Brasil, 1998). O perfil epidemiológico mantém-se inalterado nos últimos 100 anos, desde as observações feitas por Vital Brasil, ocorrendo principalmente em trabalhadores rurais, do sexo masculino, na faixa etária de 15 a 49 anos atingindo normalmente os membros inferiores (BOCHNER & STRUCHINER, 2003). Apesar de elevado índice de letalidade em acidentes ocorridos por serpentes do gênero *Crotalus*, no Brasil a maior incidência de ataques ocorre com as espécies do gênero *Bothrops* (ARAÚJO *et al.*, 2003).

O envenenamento ocorre através da inoculação do veneno das serpentes na vítima. Este contém uma variedade de proteínas com diversas atividades farmacológicas capazes de promover diferentes manifestações clínicas. A utilização de técnicas bioquímicas, imunológicas além da biologia molecular possibilita a separação e caracterização destas complexas moléculas levando ao conhecimento das suas várias formas de ação nos organismos vivos, além de possibilitar o seu uso como drogas terapêuticas e sua aplicabilidade na melhoria da produção de antivenenos.

Os venenos brutos de várias serpentes das famílias Elapidae e Viperidae mostraram ação contra bactérias gram-positivas e gram-negativas (STILES *et al.*, 1991), além de apresentarem atividade antiparasitária (GUILLAUME *et al.*, 2004). Um relato isolado mostrou que o fator lítico direto do veneno da *Hemachatus haemachatus* tem ação contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ALLOO-HIRSCH *et al.*, 1968 *apud* STILES *et al.*, 1991). Recentemente, SANTAMARÍA *et*

al., (2004) demonstraram que a miotoxina II do veneno de *Bothrops asper* é um potente antibacteriano. Atividade antiparasitária contra *Plasmodium falsiparum* tem sido atribuída a fosfolipases A2 (GUILLAUME *et al.*, 2004).

Buscando a melhoria da produção de antivenenos, THEAKSTON & REID (1979) relataram a utilização de ensaios *in vitro*, com o uso de veneno bruto como antígeno, para avaliar a potencia de antivenenos viperídeos e elapídeos.

1.2 – As serpentes

As serpentes são animais pertencentes ao filo Chordata, sub filo Vertebrata, classe Reptilia, sub-ordem Serpentes (POUGH *et al.*, 1999). Atualmente são registradas cerca de 2.900 espécies de serpentes no mundo, distribuídas em 465 gêneros e 20 famílias. No Brasil, estão representados 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies. (FRANCO, 2003). Destas as serpentes peçonhentas são representadas pela família Elapidae, na qual os indivíduos são classificados como proteróglifos, em função do tipo de dentição que apresentam, cabeça arredondada e sem fosseta loreal, destacando o gênero *Micrurus* e a família Viperidae, identificadas pela cabeça triangular, recoberta de escamas. A presença de fosseta loreal é característica da subfamília Crotalinae, na qual encontramos os gêneros *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis*.

Estes répteis habitam preferencialmente regiões temperadas e tropicais, são animais ectotérmicos, que precisam de fontes externas de energia para sobreviver (GREENE, 1997). Podem viver em ambientes aquáticos (marinho ou água doce) ou terrestre, apresentando hábitos fossoreal, terrestre e arborícola (SEIGEL & COLLINS,1993). Possuem corpo alongado, coberto por escamas córneas e sem apêndices locomotores. Apresentam órgão copulador bifurcado e

com espinhos, chamado de hemipênis. No que se refere à reprodução, podem ser ovíparas (*Micrurus* e *Lachesis muta*) ou vivíparas (*Bothrops* e *Crotalus*).

A classificação das serpentes em peçonhentas e não peçonhentas leva em consideração a capacidade destas em inocularem o veneno nas suas vítimas. Nas serpentes peçonhentas as secreções das glândulas de veneno são inoculadas pelas presas, que são dentes modificados, situados anteriormente no maxilar superior, podendo apresentar sulco, (proteróglifas, ex: *Micrurus*) ou canal, (solenóglifas, ex: *Bothrops*, *Crotalus*, *Lachesis*) (FILHO-ZAGANELLI, 1996). As serpentes áglifas e opistóglifas são ditas não peçonhentas, embora muitas delas possuam glândulas produtoras de venenos.

1.3 – O veneno

Os venenos das serpentes são formados por uma mistura complexa de proteínas, peptídeos, carboidratos, lipídeos, íons metálicos e compostos orgânicos, sendo que as proteínas e peptídeos apresentam 90% do peso seco (BIEBER, 1979 *apud* AIRD 2002). A composição e as propriedades bioquímica e farmacológica do veneno podem variar entre as espécies ou entre os indivíduos, devido a fatores como dieta, sazonalidade, habitat, idade e dimorfismo sexual (GUTIERREZ *et al.*, 1980; MÉIER *et al.*, 1986; CHIPPAUX *et al.*, 1991, FERREIRA *et al.*, 1992 *apud* FILHO-ZAGANELLI, 1996). As funções primárias do veneno são imobilização, morte e digestão da presa (KARLSSON, 1979 *apud* AIRD, 2002).

Venenos elapídeos e viperídeos apresentam fosfolipases neurotóxicas que levam a morte através de parada respiratória, bloqueando a liberação de acetilcolina na junção neuromuscular (LEE e CHANG, 1966 *apud* MILTON, 1970) Cardiotoxinas e fosfolipase A2 agem sinergicamente promovendo a lise de

eritrócitos e contribuindo para a letalidade do veneno devido a indução de parada cardíaca (KARLSSON, 1979 *apud* AIRD, 2002). Vários venenos crotalíneos possuem peptídeos hipotensivos capazes de aumentar a ação hipotensiva da bradicinina (FERREIRA, *et al.*, 1992 *apud* AIRD, 2002). Muitas proteínas são responsáveis por processos hemorrágicos, como as metaloproteases e fosfolipases (BJARNASON & TU, 1978; FRANCIS, *et al.*, 1997). Esta última também promove a formação de edema via liberação de histamina. No veneno de *Crotalus* foi encontrado um peptídeo de aproximadamente 5 kDa com atividade miotóxica (BAKER *et al.*, 1991 *apud* AIRD, 2002) A atividade miotóxica também pode ser atribuída a fosfolipídeos básicos. No geral, os venenos da família Viperidae são conhecidos por apresentarem uma significativa ação no sistema sanguíneo, enquanto essa atividade é menor nos elapídeos.

O veneno botrópico induz várias reações locais devido à combinada ação de proteases, fatores hemorrágicos, fosfolipases, e liberação de mediadores endógenos (GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989). Através de estudos comparativos dos venenos deste gênero, TAN & PONNUDURAI (1991) mostraram que existem consideráveis variações individuais em atividades biológicas tais como hemorrágica e pro-coagulante. Segundo estes autores, as diferenças nas propriedades biológicas também podem ser usadas para diferenciação taxonômica da maioria das serpentes examinadas.

1.4 – *Bothrops jararaca*

A espécie de serpente *B. jararaca* (Fig. 1) pertence à família Viperidae, subfamília Crotalinae, gênero *Bothrops*. Na América do sul, o gênero *Bothrops* é responsável por 90% dos acidentes humanos provocados por mordidas (CARDOSO, 1985). Este gênero é representado por 44 espécies sendo que 22 podem ser encontradas no Brasil. Estudos epidemiológicos na Região do Triângulo Mineiro, Minas Gerais e áreas adjacentes no estado de Goiás revelaram que 74% dos acidentes ofídicos ocorreram devido a serpentes do gênero *Bothrops*, sendo o restante por *Crotalus* (24%) e *Micrurus* (2%) (SILVA *et al.*, 2003).



Figura 1: Foto *Bothrops jararaca*.

No Brasil, a espécie *B. jararaca* é responsável pela maioria dos casos de envenenamento humano, tornando-a uma das espécies mais importantes do ponto de vista médico (ROSELD, 1971 *apud* CARNEIRO *et. al*, 2002). Componentes

deste veneno promovem vários danos locais na vítima, caracterizados principalmente por reação inflamatória aguda com um grande influxo de células, liberação de citocinas e produtos microbicidas como reativos do oxigênio (CARNEIRO *et al.*, 2002). A dose letal média (DL₅₀) do veneno injetado intraperitonealmente pode ser estimada por 47,5 µg/camundongo, com uma dose hemorrágica mínima de 16,1 µg/rato, e dose necrosante mínima de 105,8 µg/rato (SANCHES, *et al.*, 1991).

Muitas enzimas e proteínas têm sido purificadas e caracterizadas do veneno de *B. jararaca*. SOSA *et al.* (1979) caracterizaram enzimas com atividade fosfolipásica, e estas apresentavam hemólise do tipo indireto. TANIZAKI *et al.* (1989) purificaram a botrolisina uma metaloprotease hemorrágica. O estudo deste veneno permitiu a descoberta da bradicinina por ROCHA –e – SILVA *et al.* em 1949 (FRANÇA & SANT`ANA-MALAUQUE, 2003). Cinco novos peptídeos potenciadores de bradicina foram purificados por cromatografia líquida e tiveram sua seqüência determinada por espectrometria de massa (IANZER *et al.*, 2004). Também foram determinadas as seqüências de aminoácidos da região N-terminal de três metaloproteases (jararafibrases I, III e IV) com atividade fibrinolítica e hemorrágica (MARUYAMA *et al.*, 2002). NISHIDA *et al.* (1994) purificaram a botrombina, uma proteína tipo-trombina com massa entre 33 e 35 kDa que atua no fibrinogênio para formar fibrina, tendo sido mais tarde cristalizada por WATANABE *et al.* (2002). PAINE *et al.* (1992) denominaram de jararagina uma metaloprotease com atividade hemorrágica e massa molecular de 55 kDa. A mesma promoveu a diminuição na taxa de proliferação de células de melanoma humano (CORREA Jr. *et al.*, 2002) e provocou sangramento nos pulmões de camundongo (ESCALANTE *et al.*, 2003). A atividade anti-tumoral do veneno bruto de *B. jararaca* em células de ascites Ehrlich foi comprovada por ensaios *in vivo* e *in vitro* por DA SILVA *et al.*

(2002). VIEIRA *et al.* (2004) purificaram a jararassina-I, uma proteína de 30 kDa com atividade fibrinogenolítica e coagulante. SERRANO *et al.* (1999) purificaram uma fosfolipase que promove a inibição de agregação de plaquetas, esta chamada de BJ-PLA é composta por 124 resíduos de aminoácido.

FUJIMURA *et al.* purificaram duas formas distintas de botrocetina, que são proteínas tipo-lectina tipo-C. Os venenos de *B. jararaca* exibem níveis variáveis de atividade L-aminoácido oxidase, indo de 19 a 97 nmol de substrato sendo oxidado por 1mg de veneno por minuto (TAN & PONNUDURAI, 1991), porém nenhum relato da purificação da enzima foi encontrado.

1.5 – L-aminoácido oxidase (LAO)

L-aminoácido oxidases (Fig. 2) são flavoenzimas que catalisam a desaminação oxidativa de um substrato L-aminoácido, a α -ceto ácido, com a produção de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia (NH_3). Frequentemente são homodiméricas, com massa molecular em torno de 110 a 150 kDa, determinadas por cromatografia de gel filtração. Encontram-se amplamente distribuídas em vários organismos e em venenos de serpentes (CURTI *et al.*, 1992). A enzima funcional é um dímero, sendo que cada subunidade consiste de três domínios; um domínio de ligação ao grupo prostético (FAD), um de ligação ao substrato e um domínio helicoidal. Com menos frequência, FMN pode ser encontrada como grupo prostético (PONNUDURAI *et al.*, 1994). LAO ácidas, neutras e básicas têm sido isoladas, porém não se sabe se a diferença de cargas reflete nas muitas propriedades farmacológicas destas enzimas (DU & CLEMETSON, 2002). Encontram-se amplamente distribuídas em vários organismos e em venenos de serpentes (CURTI *et al.*, 1992).



Figura 2: L-aminoácido oxidase da serpente *Callosema rhodostoma* (PAWELEK *et al.*, 2000)

A enzima funcionalmente é um dímero, onde cada subunidade consiste de três domínios, um domínio de ligação ao grupo prostético (FAD), um de ligação ao substrato e um domínio helicoidal. Com menos freqüência, FMN pode ser encontrada como grupo prostético (PONNUDURAI *et al.*, 1994). LAO ácidas, neutras e básicas têm sido isoladas, porém não se sabe se a diferença de cargas reflete nas muitas propriedades farmacológicas destas enzimas (DU & CLEMETSON, 2002).

A atividade da LAO encontra-se presente em vários venenos do gênero *Bothrops*, com intensidades distintas na sua atividade específica (PESSATI *et al.*, 1995). Sugere-se que o papel primário da LAO no veneno seja a paralisia da presa promovendo hipotensão através da liberação de H₂O₂, que irá ativar a

guanilato ciclase a produzir cGMP que agirá nas células cardíacas diminuindo a contração. Age também no processo de digestão, lisando a célula. Apesar de alguns estudos já terem sido realizados, a LAO está dentro de um grupo de enzimas com função não bem conhecida (AIRD, 2002).

Diferentes atividades biológicas têm sido relatadas, incluindo indução de apoptose em várias células humanas (SUHR *et al.*, 1996; AHN *et al.*, 1997; MASSUDA *et al.*, 1997; TORRI *et al.*, 1997; ALI *et al.*, 2000; SUN *et al.*, 2003;), inibição e indução de agregação de plaquetas (TAKATSUKA *et al.*, 2001; WEI *et al.*, 2002; STÁBELI *et al.*, 2004), atividade anticoagulante (SAKURAI *et al.*, 2003), atividade anti-viral (ZHANG *et al.*, 2003), anti-parasitária (TEMPONE *et al.*, 2001; FERNANDEZ-GOMES *et al.*, 1994) anti-bacteriana (STILES *et al.*, 1991; BLAYLOCK, 2000; JIMBO *et al.*, 2003; STÁBELI *et al.*, 2004) e atividade hemolítica (ALI *et al.*, 2000). Todas essas atividades estão relacionadas com a produção localizada de H₂O₂, sendo que a adição de antioxidante (catalase) inibe sua ação biológica.

1.6 – Proteínas tipo-lectina tipo-C

Recentemente, um grande número de proteínas tipo-lectina tipo-C que estão relacionadas com os processos de trombose e hemostase através de ativação ou inibição específica de receptores de membrana de plaquetas, têm sido isoladas e caracterizadas de várias espécies de serpentes. Essas proteínas são estruturalmente similares às proteínas tipo-lectina. Porém a maioria delas não possui o sítio de ligação ao carboidrato. Comumente, são encontradas como heterodímero com subunidades homólogas (cadeia α e β) ligadas por uma única ponte dissulfeto (OGAWA *et al.*, 2005).

ANDREWS *et al.* (1996) purificaram uma proteína tipo-lectina tipo-C de 50 kDa da serpente *Trimeresurus albolabris*, denominada alboagregina, e duas proteínas de 25 kDa, CHH-A e CHH-B, de *Crotalus horridus horridus*. Estas se ligam à proteína GPIb das plaquetas, impedindo a ligação do fator de von Willerbrand (vWF), promovendo a inibição da agregação plaquetária. Outros exemplos de antagonistas de agregação plaquetárias são agkicetina de *A. actus*, mamusigina de *A. halys blomhoffi*, agkicetina-C de *D. acutus* (CHEN & TSAI, 1995; SAKURAI *et al.*, 1998; CHEN *et al.*, 2000; *apud* OGAWA, *et al.*, 2005).

Com atividade oposta, aggreтина uma proteína heterodimérica de 25 kDa consistindo de duas subunidades de 18 e 15 kDa ligadas por pontes dissulfetos, foi isolada do veneno da serpente *Calloselasma rhodostoma*, apresentando atividade de agregação de plaquetas (HUAG *et al.*, 1995). A Bitiscetina, da serpente *Bitis arietanse*, também considerada um agonista na agregação de plaquetas, age interagindo diretamente com o fator de vWF (HAMAKO *et al.*, 1996)

Do veneno da serpente *B. jararaca*, FUJIMURA *et al.* (1991) purificaram duas formas distintas de botrocetina, que promovem a agregação de plaquetas via interação com o vWF. A espécie de cadeia única apresenta massa molecular de 28 kDa antes e de 32 kDa depois de reduzir as pontes dissulfetos. Já a espécie de duas cadeias possui uma massa aparente de 27 antes e de 15 e 14,5 kDa após redução, sendo que a botrocetina de duas cadeias é 34 vezes mais ativa que a de cadeia única. Pouco depois, USAMI *et al.* (1993) determinaram a seqüência completa de aminoácidos e a localização das pontes dissulfetos da molécula de duas cadeias. A botrocetina é heterodimérica composta de duas subunidades, a subunidade α com 133 resíduos de aminoácido e a subunidade β com 125 resíduos. Estão presentes três pontes dissulfetos intra-cadeia e uma intercadeia. A

proteína dimérica foi purificada por coluna de troca iônica DEAE-Sepharose, seguido por cromatografia de gel filtração em HPLC utilizando duas colunas seriadas (TSK G3000SW e G2000SW) e posteriormente por coluna de interação hidrofóbica phenyl-Superose HR 5/5 acoplada ao HPLC. Os autores ainda fizeram o uso de cromatografia de fase reversa para o sequenciamento.

1.7 – Aplicações biotecnológicas dos venenos ofídicos

Algumas proteínas com atividades antibacteriana e antiparasitária estão sendo estudadas por vários grupos de pesquisa, sendo muitas isoladas de venenos de serpentes. Dois componentes antibacterianos do veneno de *Pseudechis australis* foram purificados, denominados de LAO1 e LAO2, estas são proteínas com atividade LAO (STILES *et al.*, 1991). A ação antibactericida de PLA₂ foi primeiramente relatada para a miotoxina de *B. asper*, demonstrando um mecanismo bactericida independente da catálise (PÁRAMO *et al.*, 1998). Recentemente, SANTAMARIA *et al.*, (2004) demonstraram que tanto as fosfolipases inativas cataliticamente, como as ativas, possuem atividade antibactericida. No mesmo estudo, os autores construíram peptídeos correspondentes aos resíduos 115-129 da miotoxina II de *B. asper* e observaram uma correlação entre a potência bactericida e os resíduos de triptofano. Do veneno de *B. alternatus*, foi isolado a proteína Balt-LAAO-I, que apresentou atividade antibactericida contra *S. aureus* e *E. coli*. Esta é uma glicoproteína ácida, cuja ação não está envolvida com atividade fosfolipásica (STÁBELI *et al.*, 2004). Ao marcarem o veneno da serpente *Cerastes cerastes* com I¹²⁵ e posteriormente incubarem com parasitas, FERNANDEZ-GOMEZ *et al* (1994) identificaram três componentes preferenciais que interagem com estes patógenos. Outro veneno

botrópico, *B. moojeni*, contém uma proteína de 140 kDa com atividade L-aminoácido oxidase e atividade antiparasitária (TEMPONE *et al.*, 2001). GUILLAUME *et al.* (2004) inibiram o desenvolvimento do *Plasmodium falciparum* com o uso de sete isoformas de fosfolipases isoladas de abelha, escorpião e serpentes.

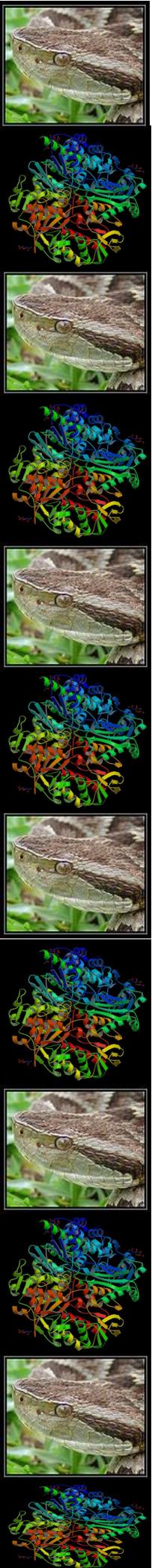
As fosfolipases secretadas apresentam várias funções no veneno e, uma destas, é a atividade hemolítica. SOARES *et al.* (2001) encontraram que a pirotoxin III, uma fosfolipase A2 do veneno de *B. pirajai*, além de apresentar atividade bactericida contra *E. coli*, é uma potente molécula hemolítica. A jerdoxin (PLA₂) isolada do veneno de *Trimeresurus jerdoxin*, com massa molecular de 15 kDa, mostrou ser capaz de induzir 97% de hemólise quando utilizou-se 2 µg/mL da enzima com fosfatidil colina e Ca⁺² (LU *et al.*, 2002). O veneno bruto de *Micrurus altirostris*, do Rio Grande do Sul, apresenta alta atividade edematogênica, letal e atividade hemolítica indireta. O veneno bruto e a enzima LNV-LAO de *Eristocophis macmahoni* exibiram hemólise em células de carneiro, esta última com doses menores que 1 µg (ALI *et al.*, 2000).

1.8 – Soroterapia

Muitas proteínas dos venenos podem promover a morte da vítima que foi acidentada pela mordida da serpente, e o único tratamento específico para o envenenamento é o uso de antivenenos, que normalmente são preparados através da hiperimunização de cavalos com misturas de venenos representativos de cada região. A potência de antivenenos tem sido tradicionalmente medida através de testes de neutralização da letalidade (WHO, 1981). Porém, além de caros e de despendarem muito tempo para sua realização, estes ensaios

promovem o sofrimento e a morte de muitos animais. Por isso, em um encontro realizado pela Organização Mundial de Saúde, e com a presença de pesquisadores de vários países, ficou enfatizado a necessidade da realização de pesquisas que busquem uma metodologia aplicável para substituir os testes de letalidade *in vivo* (THEAKSTON *et al.*, 2003). Testes imunoenzimáticos apresentaram resultados promissores para alguns antivenenos testados, demonstrando altos índices de correlação entre anticorpos dosados por ELISA e soro neutralização (GUTIÉRREZ *et al.*, 1988, ALAPE-GIRÖN *et al.*, 1997). MARIA *et al.* (1998) investigaram a correlação entre a neutralização da toxicidade letal *in vivo*, a neutralização da atividade hemolítica (PLA₂) e os níveis de anticorpos medidos por ELISA, utilizando o veneno de *B. jararaca* e a fração tóxica da cromatografia de gel filtração como antígenos.

Tendo em vista a riqueza de informações e grande aplicabilidade biotecnológica que pode ser conseguida com exploração dos compostos bioativos presentes nos veneno, bem como a necessidade de se descobrir novas drogas que possam inibir o crescimento de bactérias e parasitárias sem alta toxicidade e efeitos colaterais para o hospedeiro. Este trabalho utilizou-se do veneno da serpente *B. jararaca* para purificar componentes antibacterianos. Durante o desenvolvimento deste objetivo verificou-se também que o veneno bruto e alguns componentes apresentaram atividade anti-*Lieshmania* e hemolítica. Purificou-se uma proteína que quando utilizada como antígeno em placas de ELISA reagiram com os antivenenos botrópicos de cavalo com diferentes potências neutralizantes de modo proporcional.



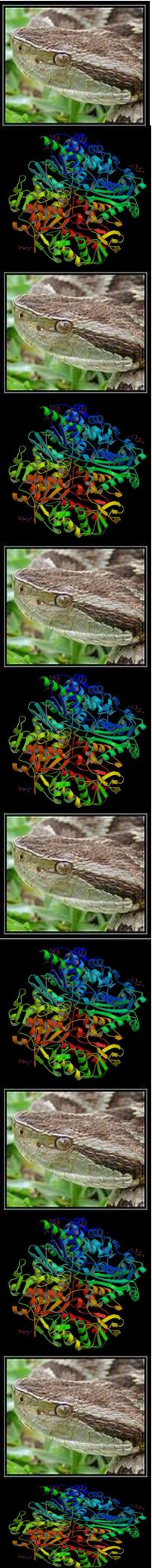
2 – Objetivos

2.1 – Objetivo geral

Purificação e caracterização de componentes antibacterianos do veneno de *B. jararaca* e de proteínas do mesmo veneno que possam ser utilizadas como antígenos em ensaios *in vitro* para determinação da potência neutralizante de antivenenos botrópicos.

2.2 – Objetivos específicos

- Verificar a capacidade antibacteriana de venenos de animais peçonhentos;
- Ensaiar a susceptibilidade de bactérias gram-positivas e gram-negativas frente aos venenos brutos com atividade antibacteriana;
- Purificar o(s) componente(s) com capacidade antibacteriana, do veneno bruto.
- Testar atividades enzimáticas e biológicas, tais como L-aminoácido oxidase, antiparasitária e hemolítica do(s) componente(s) antibacteriano(s) purificado(s).
- Caracterizar estruturalmente a(s) proteína(s) purificada(s).
- Buscar similaridade desta proteína como outras proteínas em banco de dados.
- Correlacionar os títulos de anticorpos obtidos por ELISA com a potência neutralizante de antivenenos botrópicos, utilizando proteína purificada do veneno como antígeno.



3 – Materiais e Métodos

3.1 – Venenos

Os venenos brutos dos da abelha *Apis mellifera*, da lagarta *Lonomia* sp., das aranhas *Lycosa* sp. e *Phoneutria nigriventer*, dos escorpiões *Tityus bahiensis* e *T. serrulatus*, das serpentes *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta. muta* foram mantidos liofilizados em temperatura de -20°C , no Laboratório de Imunoquímica de Toxinas (ICB-UFMG). O veneno bruto liofilizado da serpente *B. jararaca* foi gentilmente cedido pela Fundação Ezequiel Dias (FUNED), Belo Horizonte, Minas Gerais, sendo acondicionado em tubo plástico e estocado à temperatura de -20°C até o seu uso.

3.2 – Reagentes

Todos os reagentes utilizados no presente trabalho apresentavam alto teor de pureza (P.A.), sendo obtidos comercialmente pelas empresas Merck, Sigma, Gibco BRL, Difco, Inlab e Vetec. As colunas cromatográficas utilizadas nos processos de fracionamento do veneno foram da Pharmacia e Shimadzu.

3.3 – Dosagem de proteínas

Os conteúdos protéicos do veneno bruto e das frações purificadas foram determinados pelo método de BRADFORD (1976), utilizando-se albumina de soro bovino (BSA - Sigma) como padrão.

3.4 – Atividade antibacteriana

3.4.1 – Ensaio por difusão em agar

Os testes antibacterianos foram realizados no Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios, Departamento de Microbiologia, da Universidade Federal de Minas Gerais (ICB-UFMG), sob a coordenação da Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho. Os ensaios foram realizados pelo método de difusão em ágar de acordo com a metodologia descrita pelo NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS (2001). As bactérias foram solubilizadas em solução salina 0,85% (p/v), e posteriormente inoculada homogeneamente em placa de Petri contendo meio sólido BHI – *Brain-heart infusion* - (BHI ágar 5,2% (p/v), extrato de levedura 0,5% (p/v)). No meio solidificado foram feitos orifícios, onde foram aplicados 40 µg das amostras em salina para um volume final de 50 µL (0,8 mg/mL). As placas foram incubadas à 37°C, até que fosse observado o crescimento bacteriano. A atividade antibacteriana foi observada pela formação de um halo de inibição em torno do local onde foi aplicada a amostra. Todos os experimentos foram realizados em duplicata, fazendo-se em duas placas de cultura distintas.

3.4.2 – Escolha do veneno

Treze venenos foram testados segundo a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano (*S. aureus*) pelo ensaio de difusão em ágar. Os venenos testados foram: da abelha *Apis mellifera*, da lagarta *Lonomia* sp., das aranhas *Lycosa* sp. e *Phoneutria nigriventer*, dos escorpiões *Tityus bahiensis* e *T.*

serrulatus, das serpentes *Bothrops alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni*, *B. neuwiedi*, *Crotalus durissus terrificus* e *Lachesis muta muta*.

3.4.3 – Sensibilidade de bactérias frente ao veneno botrópico.

Bactérias Gram-positivas e Gram-negativas foram testadas quanto a sua sensibilidade frente aos venenos brutos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*. Considerando as exigências nutricionais das bactérias o meio sólido BHI foi suplementado com 0,5% (p/v) de extrato de levedura, 5µg/mL de menadiona e hemina. As bactérias aeróbias como *Escherichia coli* (ATCC 25922), *Listeria monocytigenesis* (ATCC 15313), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *S. epidermidis* (ATCC 12228), foram incubadas em estufa à 37°C, enquanto as bactérias anaeróbias ou anaeróbias facultativas como *Actinobacillus actinomycetencomitans* (ATCC 29523) *Bacteróides fragilis* (ATCC25285), *Eikenella corrodens*, *Enterococcus faecalis* (ATCC 19433), *Eubacterium lentum*, *Peptoestreptococcus anaerobius* (ATCC 27337), *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermédia* (ATCC 25611), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919) e *Streptococcus mutans* (ATCC 25175), foram incubadas em câmara de anaerobiose, onde se tem ausência de oxigênio, a 37°C.

3.5 – Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

Com o intuito de observar o perfil protéico do veneno bruto e das frações purificadas, foi realizada a eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de dodecilsulfato de sódio (SDS) segundo o método de LAEMMLI (1970).

O gel de separação de 12,5% foi preparado a partir de uma solução estoque de acrilamida 30% (p/v), bis-acrilamida 0,8% (p/v), SDS 10% (p/v), persulfato de amônio 10% (p/v), TEMED (1:2000 v/v), Tris-HCl 1,5M, pH 8,8. Para o gel de aplicação, a solução estoque foi diluída a 4% em Tris-HCl 0,5 M pH 6,8 e SDS 0,1% (p/v).

As amostras antes de serem aplicadas no gel foram solubilizadas em uma solução contendo Tris-HCl 0,7 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,25% (p/v) e glicerol 10% na ausência (sem redução) ou na presença (com redução) de β -mercaptoetanol. Estas amostras foram fervidas a 100°C por 5 minutos. A eletroforese foi desenvolvida com voltagem de 120 volts.

Após a migração das bandas proteicas, os géis foram corados pelo método de azul de Comassie ou pela prata. Na coloração por azul de Comassie o gel foi corado por uma solução de Comassie Blue R250 em etanol a 50% (v/v) e ácido fosfórico a 10% e descorado por lavagens sucessivas com solução descorante (ácido acético 10%, metanol 50% e água destilada 40% v/v). Na coloração pela prata o gel foi primeiramente fixado em metano 50%, ácido acético 12%, formaldeído 0,04% (v/v) em água, em um tempo de 1 hora. Posteriormente realizou-se uma rápida incubação em solução de tiosulfato de sódio 0,04% (p/v) e depois em solução de prata (nitrate de prata 0,1% (p/v) e formaldeído 0,075% (v/v)) por 20 minutos. Para revelar a coloração o gel foi incubado com carbonato de sódio 6% (p/v), formaldeído 0,05% (v/v) e 2 mL da solução de tiosulfato de sódio até o aparecimento das bandas. A reação foi parada com uma solução de

metanol 50% e ácido acético 12% (v/v). Sempre entre as incubações lavava-se o gel com água destilada.

3.6 – Ensaio de atividade L-aminoácido oxidase (LAO)

O ensaio de atividade LAO consiste em um ensaio enzimático, no qual um substrato, no caso um L-aminoácido, é oxidado pela enzima LAO gerando como um dos produtos da reação o H_2O_2 , que é então utilizado pela peroxidase de rabanete para oxidar a *o*-dianisidina a um radical cátion podendo ser monitorada pela luz visível.

Realizou-se o ensaio enzimático segundo SAKURAI *et al.* (2001) com modificações. Uma mistura de reação contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de peroxidase de rabanete, 100 μM de L-leucina, 10 μM de *o*-dianisidina, em 0,1 M de Tris-HCl pH 7,8 e as frações purificadas em um volume final de 1 mL foi incubado à 25° C por um período de 30 minutos. O aumento da absorbância foi monitorado a 436 nm por espectrofotômetro (Shimadzu – UV 160A). Uma unidade de atividade enzimática é definida como a oxidação de 1 μM de L-leucina por minuto, e a diferença no coeficiente de absorção molar é de $8,31 \times 10^{-3} \text{ M}^{-1} \text{ cm}^{-1}$. Os ensaios foram realizados em duplicatas.

Para verificar qual das frações purificadas apresentavam atividade LAO, foram utilizados 100 μL de cada tubo e, quando a atividade foi realizada com as frações cromatográficas, já liofilizados e dosadas, foram utilizados 2 μg de proteína por amostra.

Os seguintes substratos foram utilizados para determinar a relativa especificidade da fração da cromatografia de afinidade por heparina: L-alanina, L-arginina, L-asparagina, L-cisteína, L-fenilalanina, L-histidina, L-isoleucina, L-

leucina, L-lisina, L-metionina, L-prolina, L-treonina, L-triptofano, L-serina, L-valina. A mistura da reação foi realizada como descrito acima, com 100 µg/mL de cada aminoácido e 2,0 µg/mL da fração.

3.7 – Fracionamento do veneno bruto de *B. jararaca*

3.7.1 – Cromatografia por gel filtração em sistema de FPLC

O veneno bruto de *B. jararaca* foi primeiramente fracionado por cromatografia de gel filtração na coluna semi-preparativa (10mm de diâmetro) Superdex™ 75 HR10/30 (Pharmacia) acoplada ao sistema de FPLC – *Fast Performance Liquid Chromatography* - (Pharmacia). Esta coluna possui como fase estacionária ligações cruzadas entre dextran e agarose, apresentando uma ótima resolução de separação de proteínas em torno de 3000 - 70000 Da. O veneno liofilizado (500 mg de proteína) foi solubilizado com o tampão de eluição, formiato de amônio 0,15M pH 6,0 (0,5 mL), e aplicado na coluna (10 mg por corrida) previamente equilibrada. O conteúdo protéico foi eluído em um fluxo contínuo de 0,5 mL/min, sendo coletado 1mL de amostra por tubo. A coleta do material foi realizada por coletor automático (Pharmacia) e a leitura da absorbância acompanhada à 280 nm. O processo cromatográfico foi realizado à temperatura ambiente. As frações foram agrupadas de acordo com os picos protéicos, sendo posteriormente liofilizadas, armazenadas -80°C e ensaiadas quanto as sua atividade antibacteriana.

3.7.2 – Cromatografia por troca aniônica em sistema FPLC

A fração da cromatografia de gel filtração que apresentou atividade antibacteriana (5mg por corrida) foi aplicada na coluna de troca aniônica (Mono Q^R HR 5/5 – Pharmacia) acoplada ao sistema de FPLC (Pharmacia), após serem resuspendidas em HEPES 20 mM, pH 8,0. No total, foram fracionados 147 mg de proteína. A coluna, que possui o $-\text{CH}_2-\text{N}^+(\text{CH}_3)_3$ como grupo trocador, foi previamente equilibrada com a solução HEPES 20mM, pH8,0, sendo as frações eluídas por meio de um gradiente linear de 0 – 0,5 M de NaCl. Frações de 1mL foram coletadas em um fluxo de 1mL/minuto, a 25°C. O perfil cromatográfico foi monitorado a 280nm e os tubos que apresentaram atividade LAO foram agrupados, liofilizados e armazenadas -80°C, para posterior ensaio de atividade antibacteriana.

3.7.3 – Cromatografia por afinidade a heparina em sistema FPLC

As amostras da cromatografia de troca aniônica que apresentaram atividade antibacteriana foram agrupadas e dialisada contra uma solução de 5 mM Mes, 5 mM Tris, 1mM benzamidina pH 6,0 (solução A), à 4°C por um período de 18 horas. Em seguida, a amostra (11 mg) foi então aplicada na coluna HiTrap Heparin (0,7 x 2,5 cm) previamente equilibrada com a solução A. Após 10 minutos deu-se início a um gradiente linear de NaCl (0 – 0,2M). Frações de 1 mL foram coletadas com o uso de um coletor automático (Pharmacia), num fluxo de 0,5 mL/min, à temperatura ambiente. O perfil cromatográfico foi monitorado a 280nm.

Todos os tubos foram ensaiados quanto à atividade LAO, sendo os que apresentaram atividade foram agrupados, liofilizados e armazenados a -80°C , para posterior ensaio de atividade antibacteriana.

3.7.4 – Cromatografia de fase reversa em HPLC

A cromatografia de fase reversa foi realizada em coluna C18 (Shimadzu) acoplada em sistema HPLC – *High Performance Liquid Chromatography* - (Shimadzu). A coluna foi previamente equilibrada em solução de TFA 0,1% (v/v), sendo as frações eluídas em um gradiente de acetonitrila 80% (v/v). Esta técnica foi utilizada com o propósito da realização do sequenciamento, determinação do peso molecular pelo espectrômetro de massa, e a verificação da pureza das amostras.

3.8 – Espectrometria de massa

A análise de espectrometria de massa foi realizada no Núcleo de Estrutura e Função de Biomoléculas, no ICB/UFMG, contando com a coordenação do Prof. Dr. Adriano Monteiro de Castro Pimenta.

A amostra de interesse, depois de purificada por cromatografia de fase reversa, foi concentrada a vácuo e ressuspendida em uma solução contendo 50% de acetonitrila e 0,1% de TFA (v/v) em água Milli-Q. Aplicou-se a amostra em um espectrômetro de massa do tipo electrospray-quadrupolo-TOF (ESI-Q-TOF Micro) da Micromass, a um fluxo de 5-10 $\mu\text{L}/\text{min}$. A fonte de ionização foi operada de forma positiva.

3.9 – Determinação da estrutura primária de proteínas

A determinação da seqüência de aminoácidos foi realizada sob orientação do Prof. Marcelo Porto Bemquerer, no Núcleo de Estruturas e Função de Biomoléculas, do Instituto de Ciências Biológicas (UFMG).

O sequenciamento foi realizado segundo a metodologia desenvolvida por Edman (1950), automatizada. As amostras liofilizadas foram resuspendidas em 50 μ L de TFA 0,1% (v/v) e aplicadas no seqüenciador automático PPSQ-21A Protein Sequencer (Shimadzu).

3.9.1 – Processo de redução e alquilação

Antes de ser seqüenciada, a amostra passou pelo processo de redução e alquilação. A amostra (85 μ g) foi desnaturada em solução de guanidina 6 M, Tris-HCl 0,6 M pH 8,6. Posteriormente, a proteína teve suas ligações dissulfeto reduzida com 30 μ L de 2-mercaptoetanol e em seguida seus resíduos de cisteínas foram alquilados com 30 μ L 4-vinylpiridina. As duas subunidades da proteína foram separadas por cromatografia de fase reversa.

3.10 – Atividade antiparasitária

A cepa IFLA/BR/1967/PH-8 de *Leishmania leishmaniana amazonensis* encontra-se armazenada e cultivada em nosso laboratório, sendo gentilmente cedida pelo Dr. Eduardo Ferraz Coelho. O ensaio antiparasitário foi realizado segundo metodologia descrita por TEMPONE (2001), com consideráveis modificações. Os parasitas foram cultivados em meio de cultura de Schneider's

completo (meio de Schneider's (Sigma), 20% de soro fetal bovino (Sigma) inativado, 20 mM de L-glutamina, 50 µg/mL de gentamicina, 200 unid/mL de penicilina e 100 µg/mL de estreptomicina, em pH 7,4). Os parasitas permaneceram em cultivo a 23°C por um período de cinco dias. Sendo observadas a viabilidade e a ausência de agentes contaminantes, as formas promastigotas em fase estacionária de crescimento foram quantificadas em câmara de Neubauer.

Em placa de cultura celular de 96 "wells" Costar®, foram incubadas as formas promastigotas de *L. l. amazonensis* (4×10^5 / well), 0,8mg/mL de amostra, com e sem catalase (0,3 mg/mL) e meio de cultura Dulbecco's Modified Eagle's Medium (DMEM; Sigma) completo (DMEM com 20% de soro fetal bovino inativado, 4,5 g/L de glicose, 20 µg/mL de sulfato de gentamicina, 100 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina, pH 7,4) em um volume final de 150 µL/well por 18 horas a 23°C. Foram também testados grupos controles sem as amostras (controle negativo) e com peróxido de hidrogênio (controle positivo). As formas promastigotas também foram incubadas com meio de cultura Hanks Balanced Salt Solution (HBSS) completo, caracterizado pela pobreza de aminoácidos, nas mesmas condições. A viabilidade celular foi determinada pelo ensaio de MTT (3-[4,5-dimetilthiazol-2-1]-2,5difenil-tetrazolio brometo). Os experimentos foram realizados duas vezes, em triplicatas.

3.10.1 – Ensaio de viabilidade pela oxidação do MTT

A viabilidade dos parasitas foi ensaiada colorimetricamente através da oxidação do MTT pela mitocôndria da célula. O MTT (5 mg/mL) foi dissolvido em meio de cultura DMEM ou HBSS e esterilizados em filtros (0,22 µm). Após a

incubação do experimento por 18 horas a 23°C foi adicionado o MTT (0,1 mg/well) e a placa foi incubada por 4 horas a 23°C. Depois 60 µL/well de SDS-HCl (SDS 10% em 0,01M de HCl) foi adicionado seguindo mais 18 horas de incubação a 23°C. A densidade óptica foi medida a 570 nm.

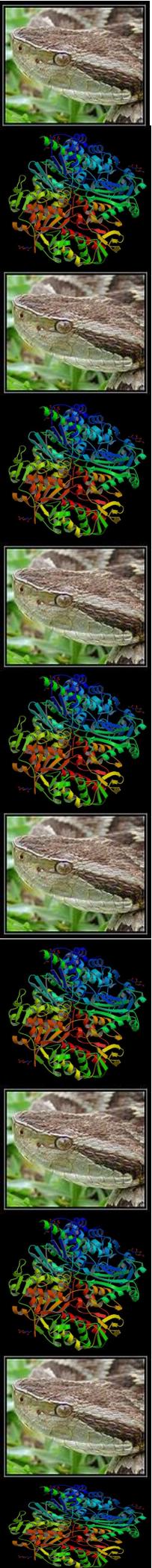
3.11 – Atividade hemolítica

As amostras de sangue de cavalo foram gentilmente cedidas pela Prof. Maria Auxiliadora Roque de Carvalho coordenadora do Laboratório de Microbiologia Oral e Anaeróbios (ICB-UFMG). A atividade hemolítica foi realizada em meio de cultura sólido TSA (bacto triptona 1,5%, bacto soytone 0,5%, NaCl 0,5% e bacto ágar 1,5%) contendo 5% de sangue de cavalo. Foram feitos orifícios nas placas sobre o meio solidificado, onde foram inoculadas as amostras em um volume final de 50 µL. As placas foram incubadas a 37°C por um período de 6 horas, quando era observada a lise das hemácias pela formação de um halo. As zonas de hemólise foram caracterizadas como zona de α -hemólise ou hemólise parcial, quando era observada a presença de hemácias íntegras e uma coloração esverdeada e zonas de β -hemólise ou hemólise total, quando havia a formação de uma zona clara, sem hemácias ao redor do orifício. A atividade hemolítica foi realizada em duplicata.

3.12 – Diferenciação da potência de antivenenos botrópicos

Os antivenenos de cavalos hiperimunizados com venenos botrópicos de diferentes potências foram obtidos do Setor de Imunização e Sangria da Fundação Ezequiel Dias (FUNED).

O ensaio de diferenciação de potência de soro foi realizado pela técnica de ELISA (*Enzyme-Linked Immunosorbent Assay*), na qual microplacas FALCON (Becton Dickinson Labware Oxnard, Canadá) de 96 wells foram sensibilizadas durante a noite a 5°C, com 100 ng/well de proteína diluída em tampão bicarbonato de sódio 0,02 M, pH 9,6. Esta amostra foi dializada contra água destilada antes da realização do ensaio. Posteriormente, as placas foram lavadas com uma solução de 0,05% de Tween 20 e 0,85 % de NaCl e bloqueadas com solução de bloqueio, caseína 2% em tampão fosfato 0,05 M e 0,015 M de NaCl, pH 7,4, por 1 hora a 37°C. Os soros anti-botrópicos foram incubados em diluições sucessivas (1:250 a 1:3200) em tampão de incubação (PBS, 0,25% de caseína e 0,05% de Tween 20). Para a visualização da ligação dos anticorpos, foram adicionadas imunoglobulinas heterólogas anti-IgG de cavalo conjugadas com a enzima peroxidase (Sigma), na diluição de 1:1500. A atividade enzimática foi então revelada com a solução de ortofenilenodiamino (OPD) como substrato (0,33 mg/mL OPD em tampão citrato pH 5,2 e 0,04% de H₂O₂). Após 15 minutos a reação é interrompida pela adição de 20 µL de ácido sulfúrico (1:20). A redução do OPD pelo peróxido de hidrogênio foi monitorada a 492 nm.



4 – Resultados

4.1 – Escolha do veneno

Inicialmente foram realizados testes preliminares para determinação do veneno a ser utilizado no presente estudo. Treze venenos de diferentes animais peçonhentos, entre os quais podemos destacar aranhas, escorpiões e serpentes, foram ensaiados segundo a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano. Utilizou-se a bactéria gram-positiva *S. aureus* como bactéria reveladora, sendo inoculado 0,8 mg/mL de cada veneno (Fig. 3).

Dentre os venenos testados, foi observado a formação do halo de inibição bacteriana em torno dos cinco venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, ou seja, *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*. Os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* apresentaram um maior halo de inibição, ao contrário o veneno de *B. neuwiedii* que se mostrou como o menos ativo.

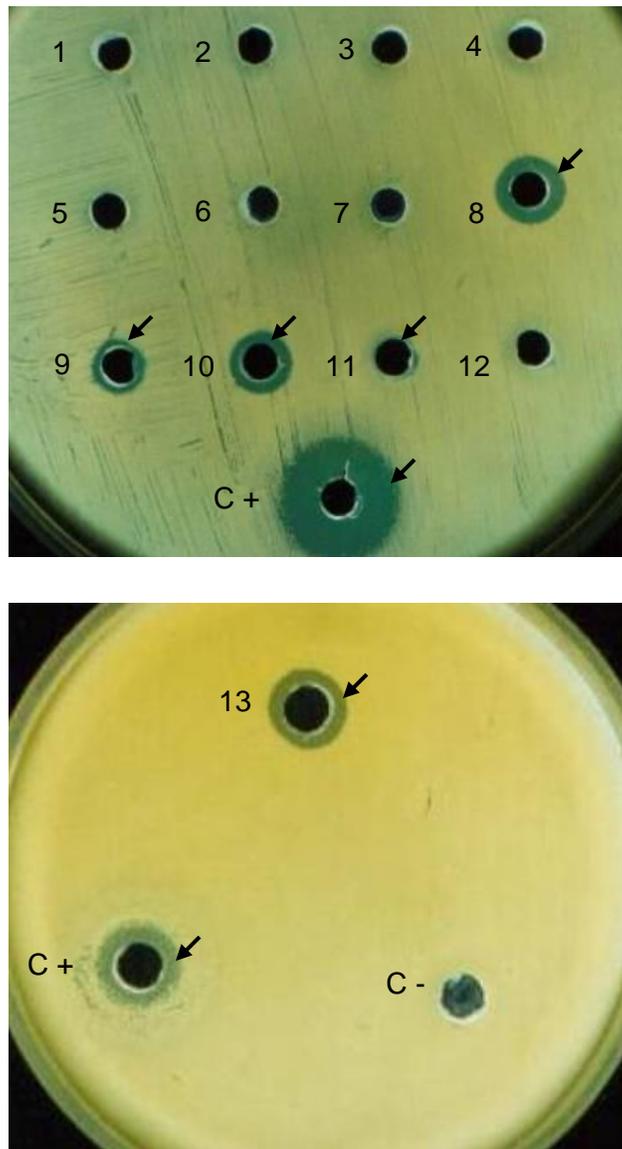


Figura 3: Inibição do crescimento de *S. aureus* frente a diferentes venenos.

Utilizou-se 0,8 mg/mL de cada veneno e *S. aureus* como bactéria reveladora. 1- *Apis mellifera*, 2- *Lonomia sp.*, 3- *Lycosa sp.*, 4- *Phoneutria nigriventer*, 5- *Tityus bahiensis*, 6- *T. serrulatus*, 7- *Lachesis muta muta*, 8- *Bothrops jararacussu*, 9- *B. alternatus*, 10- *B. moojeni*, 11- *B. neuwiedi*, 12- *Crotalus durrisus terrificus*, 13- *B. jararaca*, C +: metabisulfito, C -: solução salina. As setas mostram os halos de inibição bacteriana. As placas foram incubadas por aproximadamente 7 horas a 37°C.

4.2 – Sensibilidade das bactérias frente aos venenos botrópicos

Por terem apresentado uma maior capacidade de inibir o crescimento da bactéria *Staphylococcus aureus*, os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* foram testados contra diferentes espécies de bactérias gram-positivas e gram-negativas.

A Tabela 1 indica as diferentes espécies de bactérias que foram susceptíveis ou resistentes ao veneno das duas serpentes e a sua importância clínica. Os venenos foram capazes de inibir o crescimento tanto de bactérias gram-positivas como *Eubacterium lentum*, *Peptoestreptococcus anaerobius* (ATCC 27337), *Propionibacterium acnes* (ATCC 6919), *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *S. epidermidis* (ATCC 12228), quanto de bactérias gram-negativas como *Porphyromonas gingivalis* (ATCC 33277), *Prevotella intermedia* (ATCC 25611), *Pseudomonas aeruginosa* (ATCC 10145), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028). Algumas bactérias de grande importância médica como *E. coli* apresentaram-se resistentes aos venenos.

Tabela 1: Sensibilidade de bactérias gram-positivas e gram-negativas frente ao veneno de *B. jararaca* e *B. jararacussu*

	Bactérias	Inibição do crescimento bacteriano		Patogenia
		<i>B. jararaca</i>	<i>B. jararacussu</i>	
Gram-positiva	<i>Eubacterium lentum</i>	+	+	Infecção urinária
	<i>Peptoestreptococcus anaerobius</i> (ATCC 27337)	+	+	Infecção respiratória
	<i>Propionibacterium acnes</i> (ATCC 6919)	+	+	Infecção de pele
	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33591)	+	+	Infecção hospitalar
	<i>S. epidermidis</i> (ATCC 12228)	+	+	Infecção de pele
	<i>Enterococcus faecalis</i> (ATCC 19433)	-	-	Infecção hospitalar
	<i>Streptococcus mutans</i> (ATCC 25175)	-	-	Doença periodontal
Gram-negativa	<i>Porphyromonas gingivalis</i> (ATCC 33277)	+	+	Doença periodontal
	<i>Prevotella intermédia</i> (ATCC 25611)	+	+	Doença periodontal
	<i>Pseudomonas aeruginosa</i> (ATCC 10145)	+	+	Infecção hospitalar
	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	+	+	Intoxicação alimentar
	<i>Bacteroides fragilis</i> (ATCC 25285)	-	-	Infecção de pele
	<i>Eikenella corrodens</i>	-	-	Infecção respiratória
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 25922)	-	-	Intoxicação alimentar

Nota: O ensaio foi realizado com 0,8 mg/mL de cada veneno. (+) ocorreu inibição bacteriana (-) não ocorreu inibição bacteriana.

4.3 – Purificação do veneno de *B. jararaca*

Depois de demonstrado a sua capacidade antibacteriana, frente a algumas bactérias selecionadas, o veneno da serpente *B. jararaca* foi fracionado na tentativa de purificar o(s) componente(s) responsável por esta atividade.

4.3.1 – Cromatografia de gel filtração

O perfil cromatográfico mostrado na Figura 4 representa o comportamento da fração solúvel do veneno de *B. jararaca* (10 mg de proteína) na cromatografia por gel filtração em coluna Superdex™ 75 HR10/30 previamente equilibrada com Formiato de amônio 0,15M pH 6,0. Este processo cromatográfico foi repedido várias vezes, sendo então purificado um total de 500 mg de proteína do veneno bruto. Os tubos correspondendo a cada fração foram agrupados e liofilizados. Através desta primeira etapa de purificação, foram obtidas seis frações, sendo cada uma testada quanto a sua capacidade de inibir o crescimento bacteriano e posteriormente foi ensaiada a atividade L-aminoácido oxidase.

A fração P1, correspondente a proteínas de alto peso molecular, apresentou-se como a fração com atividade antimicrobiana (Fig. 5). Essa fração mostrou-se ainda com maior capacidade de oxidar L-leucina, promovendo evidências da sua atividade LAO (Fig. 6). A fração com atividade antibacteriana representa aproximadamente 30% do veneno bruto aplicado na coluna de gel filtração.

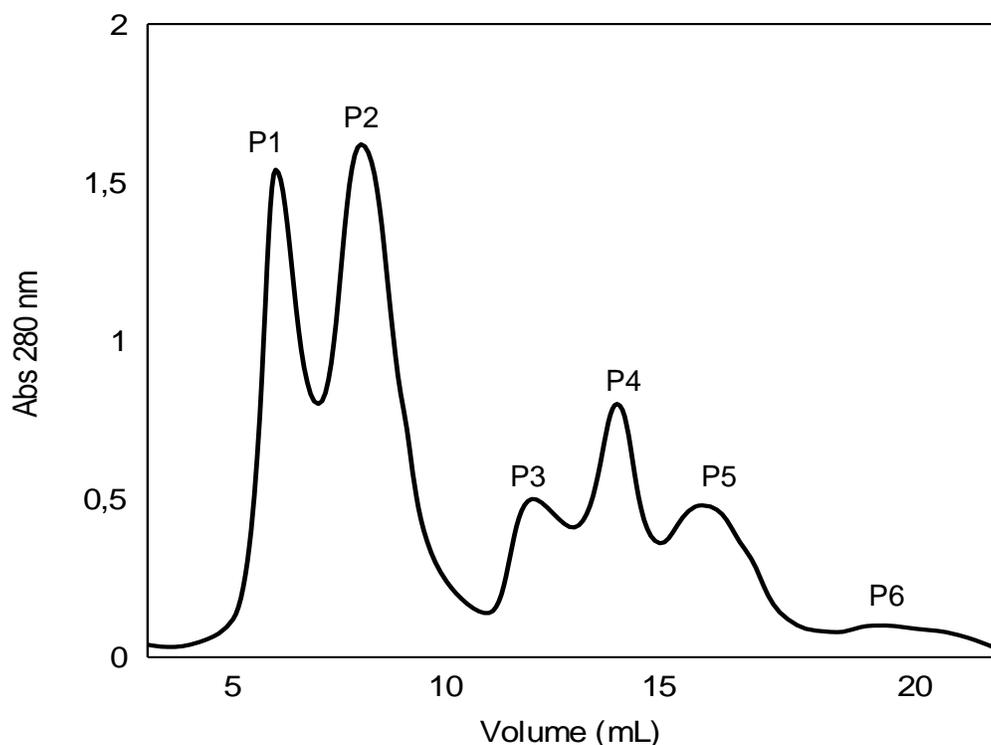


Figura 4: Perfil da cromatografia de gel filtração em coluna Superdex™ 75 HR10/30 em sistema de FPLC. O veneno bruto de *B. jararaca* (10 mg) foi aplicado em coluna Superdex™ 75 HR10/30, acoplada ao sistema de FPLC equilibrada com Formiato de amônio 0,15M pH 6,0, a um fluxo constante de 0,5 mL/min, em temperatura ambiente. As frações coletadas (1mL/tubo) foram monitoradas por absorbância a 280 nm. Fracionou-se 500 mg de proteína do veneno bruto.

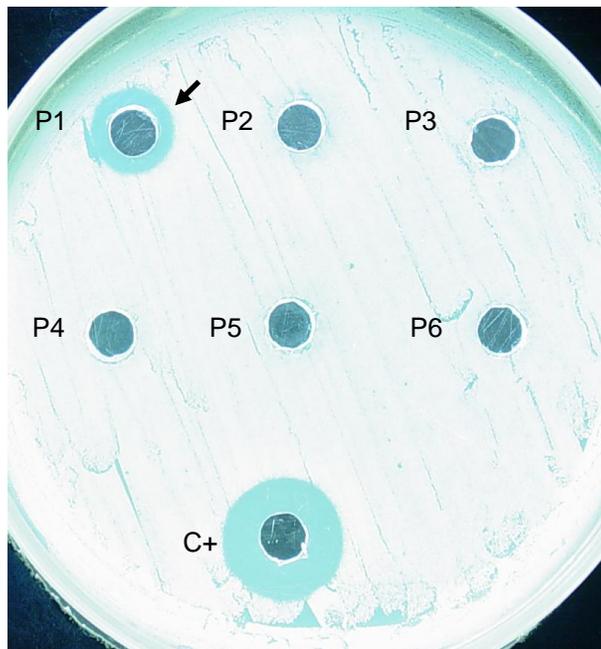


Figura 5: Ensaio de atividade antibacteriana das frações da cromatografia de gel filtração. Aplicaram-se 0,8 mg/mL de cada fração da cromatografia de gel filtração dentro de orifícios feitos no meio sólido BHI onde foi previamente inoculada a bactéria *S. aureus*. P1, P2, P3, P4, P5, e P6 correspondem respectivamente as frações de 1 a 6 eluídas da coluna Superdex™ 75 HR10/30. Como controle positivo (C+) utilizou-se o veneno bruto de *B. jararaca*. Incubou-se a placa por aproximadamente 7 horas na estufa a 37°C.

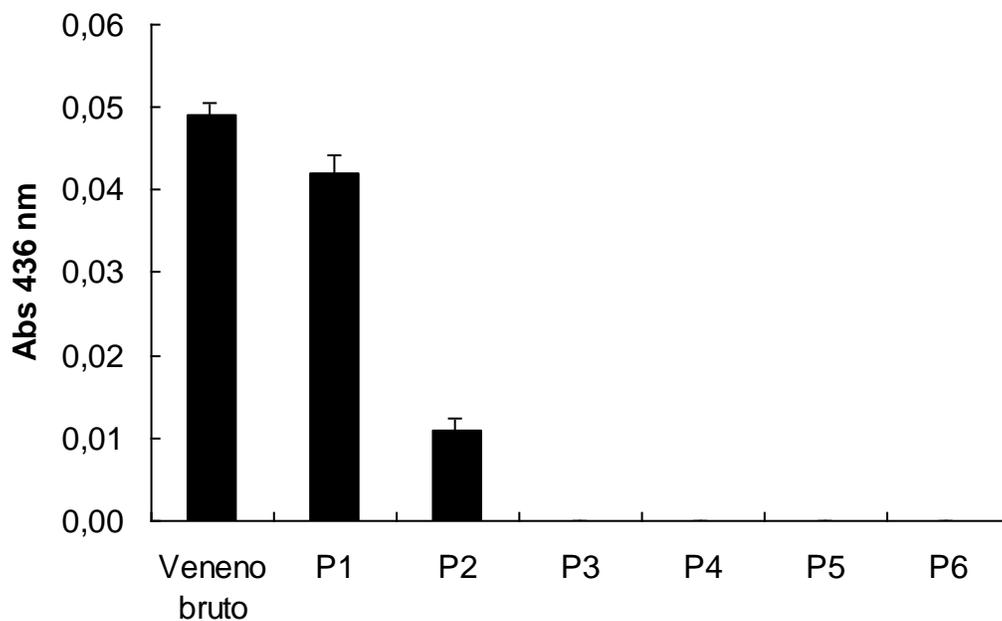


Figura 6: Ensaio da atividade L-aminoácido oxidase das frações da cromatografia de gel filtração. Foram aplicados 2 μg de cada fração da cromatografia de gel filtração (P1 – P6) e do veneno bruto de *B. jararaca* em uma mistura contendo 50 $\mu\text{g/mL}$ de peroxidase de rabanete, 100 μM de L-leucina, 10 μM de *o*-dianisidina, em 0,1 M de Tris-HCl pH 7,8 para um volume final de 1mL. A reação foi incubada por 30 minutos a 25°C, e a absorbância foi monitorada a 436nm.

4.3.2 – Cromatografia de troca iônica

No segundo passo do fracionamento, a fração P1 (5 mg) da cromatografia de gel filtração foi ressuspensa em solução HEPES 20 mM, pH8,0 para um volume final de 550 μ L, e aplicada na coluna Mono Q^R HR 5/5 acoplada ao sistema de FPLC previamente equilibrada com a mesma solução. Foram fracionados um total de 140 mg da fração P1. A figura 7 representa o perfil cromatográfico das proteínas eluídas com um gradiente linear de 0 a 0,5 M de NaCl, apresentando 8 frações. Cada um dos tubos foi ensaiado pela atividade LAO sendo as frações posteriormente agrupadas e liofilizadas para a realização da atividade antibacteriana.

Os conteúdos protéicos dos tubos eluídos nos volumes de 21 a 27 mL apresentaram atividade LAO (Fig. 7) , correspondendo as frações P5 e P6 que equivalem a 8% de proteínas do P1 da gel filtração. Como representado na figura 8 pela formação do halo de inibição, as frações P5 e P6 foram capazes de inibir o crescimento bacteriano. Estas foram novamente agrupadas para realização de novo fracionamento, sendo então denominadas TAP5/6 (Troca Aniônica Fração 5 e 6).

Nota-se através da figura 7 que a fração P8 apresentou um perfil cromatográfico sugerindo alto teor de pureza. No entanto, esta fração não apresentou as atividades biológicas testadas acima. Em função disso, buscou-se caracterizar biológica, bioquímica e imunologicamente esta proteína. Os resultados destas caracterizações serão apresentados em tópicos ulteriores.

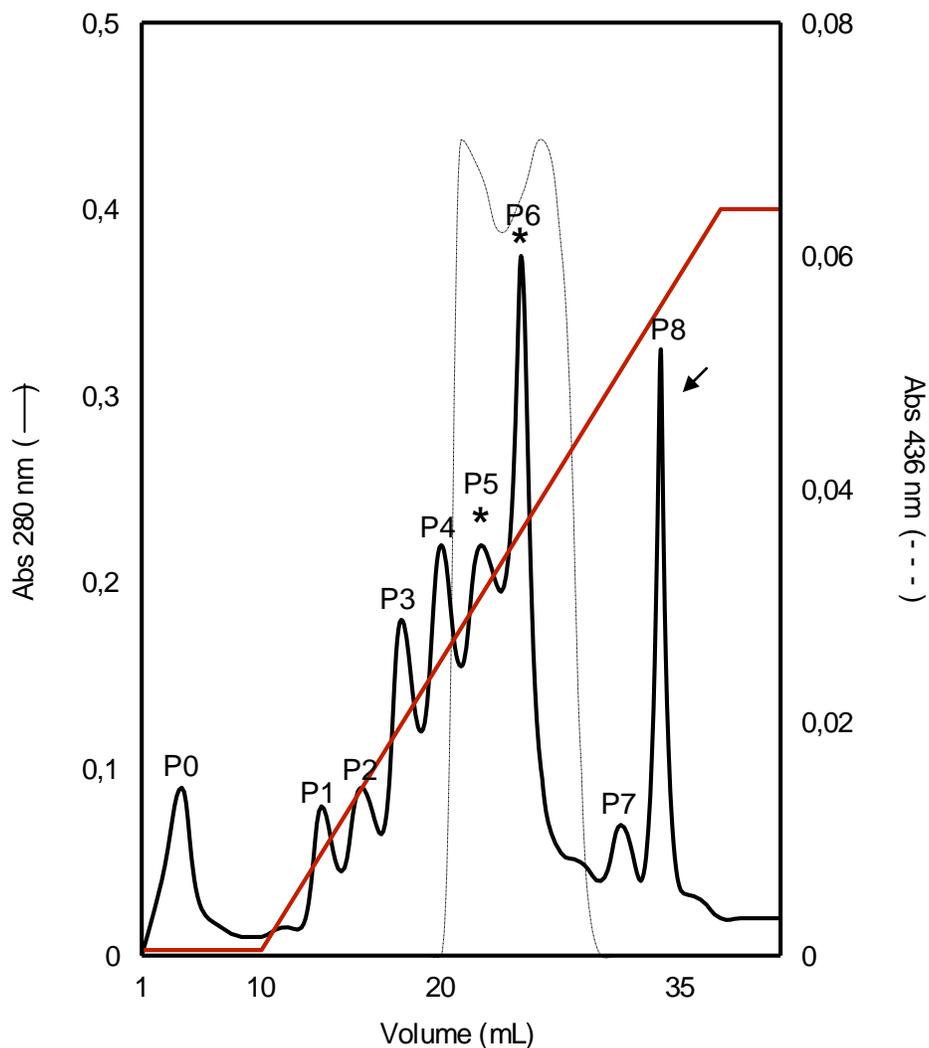


Figura 7: Perfil da cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q em sistema de FPLC. A fração P1 da gel filtração foi solubilizada em HEPES 20 mM pH8, aplicada na coluna de troca aniônica Mono Q e eluída com um gradiente linear de 0-0,5 M de NaCl em um fluxo contínuo de 1mL/min. Foi coletado 1mL/tubo de amostra. As amostras foram monitoradas a 280 nm (—). A atividade LAO foi testada em cada tubo, utilizado L-leucina como substrato, sendo acompanhada a 436 nm (-----). Frações P5 e P6 - TAP5/6 - (*) e fração P8 (→).

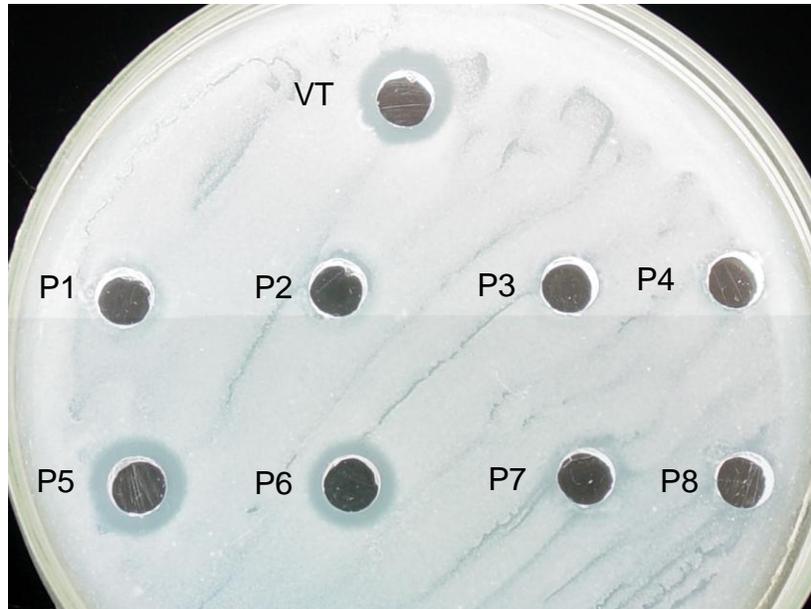


Figura 8: Ensaio de atividade antibacteriana das frações da cromatografia de troca aniônica. A atividade antibacteriana contra *S. aureus* foi ensaiada inoculando-se 0,8 mg/mL das frações da cromatografia de troca aniônica (P1 a P8) em orifícios feitos no meio sólido BHI. Como controle positivo utilizou-se o veneno bruto de *B. jararaca* (VT). A placa foi incubada a 37°C, por aproximadamente 7 horas.

4.3.3 – Cromatografia de afinidade por heparina

As frações ativas da cromatografia de troca aniônica (TAP5/6) após serem agrupadas foram dializadas contra solução A (Mes 10 mM, Tris 10 mM, Benzamidina 2 mM, pH 6.0). A figura 9 representa o perfil cromatográfico desta amostra (11 mg) após ter sido aplicada em uma coluna de afinidade HiTrap Heparin (0,7 x 2,5 cm) previamente equilibrada com a solução A. Nota-se a presença de duas frações que não apresentaram afinidade pela heparina, denominadas de HTP1 e HTP2, e de mais três frações que após terem interagido com a coluna foram eluídas com um gradiente de 0 a 0,4 M de NaCl (HTP3, HTP4 e HTP5).

Todos os tubos coletados foram testados quanto a atividade LAO e posteriormente agrupados. A fração HTP1 constituída pelos tubos 2 e 3 apresentou atividade LAO (Fig. 9), sendo então dializada contra Tris-HCl 0,05 M, pH 7,8. Como mostra a figura. 10, a atividade antibacteriana contra *S. aureus* foi posteriormente confirmada. Com a finalidade de pesquisar se o que está exercendo função antibacteriana é o H₂O₂, um produto da reação enzimática da LAO, utilizou-se a catalase (0,3 mg/mL) uma enzima capaz de degradar o peróxido de hidrogênio formando H₂O e O₂. Foi observado que na presença de catalase, a fração HTP1 perdeu sua atividade antibacteriana.

O esquema de purificação está resumido na Tabela 2, sendo que a etapa final resultou em um rendimento de 1% e o fator de purificação foi de 0,90 baseado na atividade LAO. A fração HTP1 representa 1,1% das proteínas do veneno bruto. Observar-se que não ocorreu um aumento na atividade específica durante os processos cromatográficos, fato não esperado, uma vez que quanto maior o grau de pureza de uma enzima maior seria a sua atividade específica. Tal fato pode ter ocorrido por desnaturação ou perda do cofator da enzima durante os

processos, ou por falha na realização dos ensaios de atividade durante os processos. Como os cálculos de rendimento e de fator de purificação são baseados na atividade específica, estes também podem não estar condizendo com a verdade.

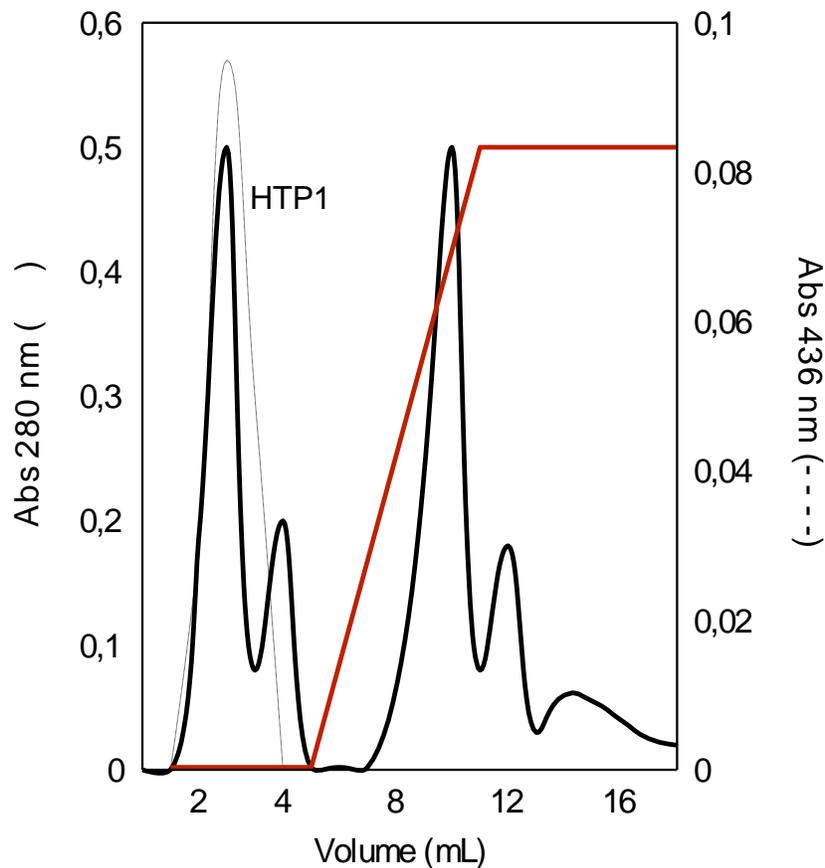


Figura 9: Perfil da cromatografia de afinidade a heparina na coluna HiTrap Heparin em sistema de FPLC. Na coluna de afinidade HiTrap Heparin equilibrada com solução Mes 10 mM, Tris 10 mM, Benzamidina 2 mM, pH 6.0 aplicaram-se 11mg da fração ativa da cromatografia de troca aniônica (TAP5/6). As frações foram eluídas com 0 a 0,4 M de NaCl, em um fluxo contínuo de 0,5 mL/min, sendo coletado 1mL por tubo. O perfil cromatográfico foi monitorado a 280 nm (—). A atividade L-aminoácido oxidase de todos os tubos foi visualizada a 436 nm (-----).

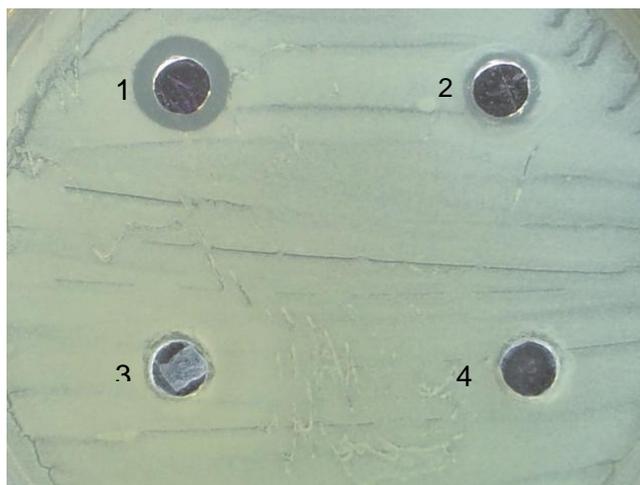


Figura 10: Ensaio da atividade antibacteriana da fração HTP1 purificada na cromatografia de afinidade a heparina. As amostras 0,8 mg/mL foram ensaiadas contra *S. aureus*. 1- veneno bruto de *B. jararaca*, 2- fração HTP1, 3- fração HTP1 com catalase (0,3 mg/mL), 4- catalase (0,3 mg/mL).

Tabela 2: Purificação da fração com atividade antibacteriana e L-aminoácido oxidase.

Etapa	Proteína		Atividade		Rendimento	Fator de purificação
	(mg)	(%)	específica (U/mg)	total (U)	(%)	
Veneno bruto	500	100	155,0	77.500	100	1,00
Superdex™ 75 HR10/30	147	29,4	135,1	19.845	25,6	0,87
Mono Q ^R HR 5/5	11	2,2	168,9	1.858	2,3	1,09
HiTrap Heparin	5,5	1,1	141,0	775,5	1,0	0,90

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a oxidação de 1 μM de L-leucina por minuto.

4.4 – Perfil eletroforético em SDS-PAGE

A figura 11 representa o perfil das proteínas, em SDS-PAGE, encontradas no veneno bruto de *B. jararaca*, na fração P1 da cromatografia de gel filtração, na fração TAP5/6 da cromatografia de troca aniônica e na fração HTP1, da cromatografia de afinidade a heparina. Nota-se que, ao final dos processos cromatográfico (coluna 4), obteve-se uma fração com três bandas de proteína com massas moleculares estimadas de 80 kDa, 60,8 kDa e 48,1 kDa.

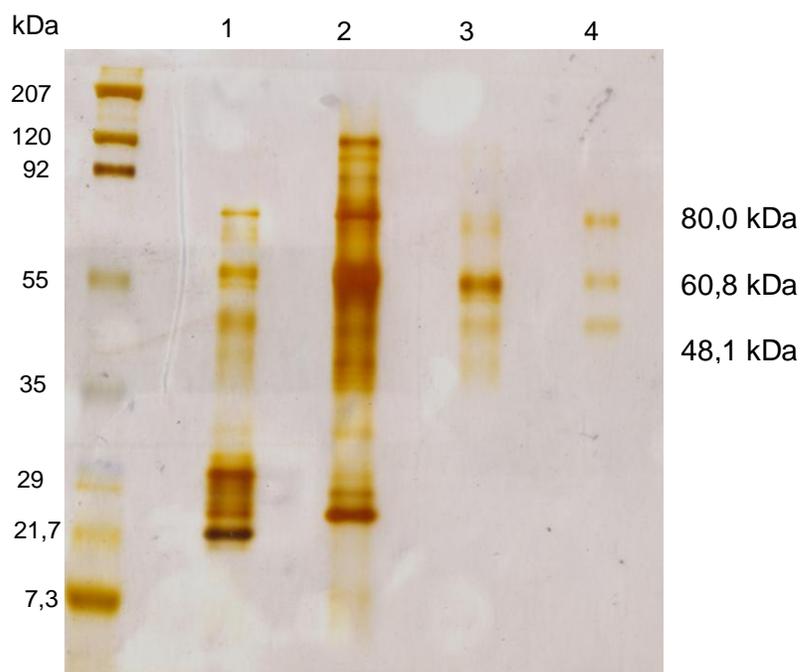


Figura 11: Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS do veneno bruto de *B. jararaca* e das frações dos processos cromatográficos. Amostras: 1- veneno bruto de *B. jararaca*; 2- fração P1; 3- fração TAP5/6; 4- fração HTP1. As amostras (2 µg) foram fracionadas em gel de poliacrilamida 12,5% e coradas por nitrato de prata.

4.5 – Atividade antiparasitária e hemolítica

Tendo em vista a capacidade antibacterina da fração HTP1 buscou-se a realização de experimentos para testar possíveis atividades antiparasitária e hemolíticas desta fração. Com base na figura 12, pode-se observar que as formas promastigotas de *L. l. amazonensis* (4×10^5 / well) em meio de cultura DMEM apresentaram-se com 69% de sobrevivência quando adicionado o veneno bruto de *B. jararaca* enquanto apenas 47,5% das células promastigotas mostraram-se viáveis após incubação com HTP1. A catalase foi capaz de inibir a ação antiparasitária do veneno bruto e da fração HTP1, permanecendo as células com 100% de viabilidade. Com o uso de H_2O_2 , utilizado como controle positivo, 71% das células permaneceram viáveis. Ao utilizar o meio de cultura HBSS completo, a viabilidade celular das formas promastigotas aumentou para 75%. A solução de Tris-HCl não influencia na atividade antiparasitária.

O veneno bruto de *B. jararaca* e as frações de todos os processos cromatográficos realizados apresentaram-se capazes de promover a lise de hemácias de cavalo. Como se pode visualizar na figura 13, ocorreu a formação de um halo esverdeado em torno das amostras, o que implica na ocorrência de lise parcial das hemácias ou α -hemólise. A fração P1 da cromatografia de gel filtração teve uma atividade hemolítica mais fraca, o que pode ser explicado pelo armazenamento desta fração a temperatura de -20°C por mais de seis meses. A catalase (0,3 mg/mL) inibiu a atividade hemolítica da fração HTP1. Ocorre um aumento no número de células lisadas com o passar do tempo, como pode ser observado nas figuras 12 A e B. Este aumento no halo de lise ocorre até que estes começam a se unir (dado não mostrado).

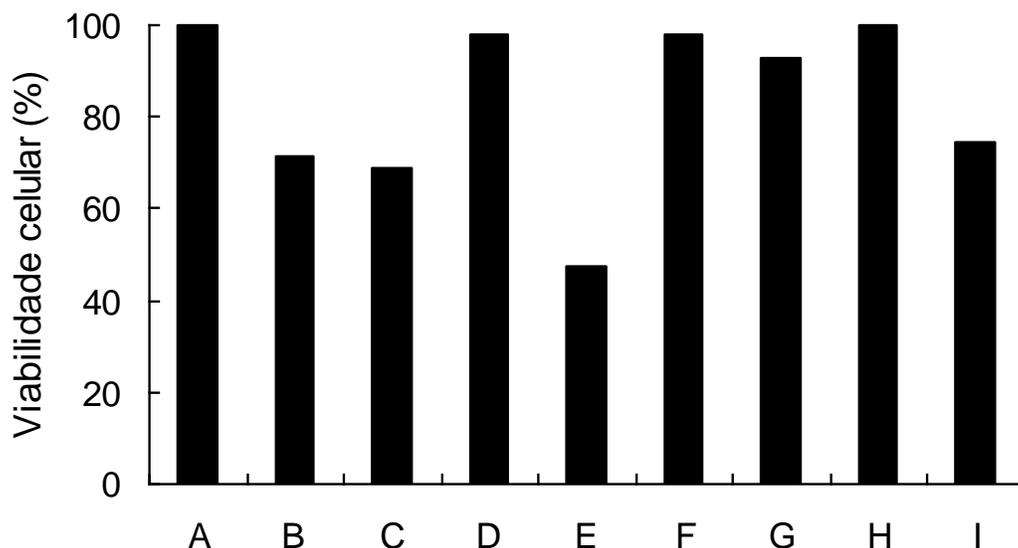


Figura 12: Caracterização da atividade antiparasitária contra *L. I. amazonensis* (A) Formas promastigotas de *L. I. amazonensis* em meio DMEM completo; (B) promastigotas em DMEM + 5mM de H₂O₂; (C) promastigota em DMEM + 0,8 mg/mL de veneno bruto de *B. jararaca*; (D) promastigota em DMEM + 0,8 mg/mL de veneno bruto de *B. jararaca* + 0,3 mg/mL de catalase; (E) promastigota em DMEM + 0,8 mg/mL da fração HTP1; (F) promastigota em DMEM + 0,8 mg/mL da fração HTP1 + 0,3 mg/mL de catalase; (G) promastigotas em DMEM + Tris-HCl 1M; (H) promastigotas em meio HBSS completo; (I) promastigotas em HBSS + 0,8 mg/mL da fração HTP1. A viabilidade está expressa em porcentagem, relativa à média das triplicatas, tomando como 100% de viabilidade celular as leituras em 570 nm dos controles de promastigotas em meio de cultura.

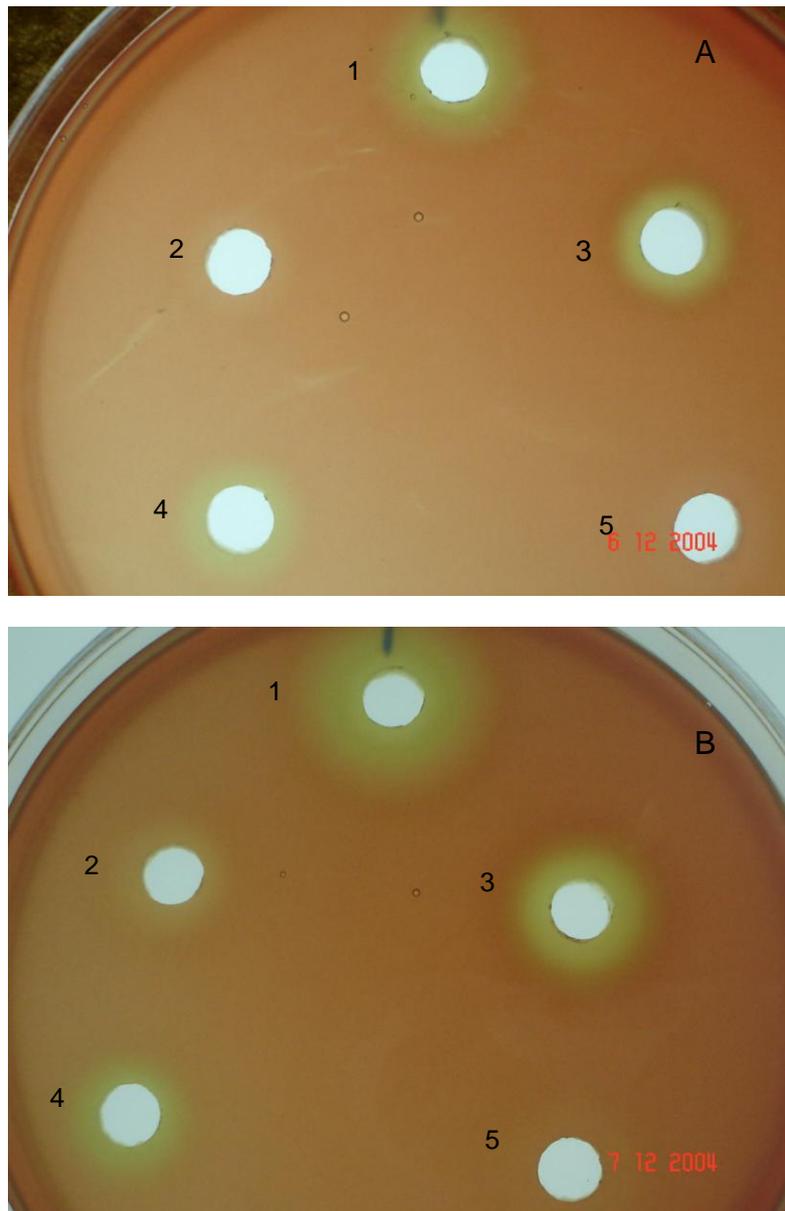


Figura 13: Ensaio hemolítico em células de cavalo. Aplicou-se 20 μg das amostras em orifícios realizados no meio TSA agar sangue. (A) Após 6 horas de incubação a 37°C; (B) Após 18 horas de incubação; 1- veneno bruto de *B. jararaca*; 2- fração P1; 3- fração TAP5/6; 4- fração HTP1; 5- fração HTP1 com catalase (0,3 mg/mL).

4.6 – Atividade específica por diferentes substratos

A figura 14 representa a capacidade da fração HTP1, que já havia mostrado atividade L-aminoácido oxidase sobre L-leucina, de oxidar diferentes L-aminoácidos. A atividade específica foi medida através da produção de peróxido de hidrogênio, utilizando a o-dianisidina como indicador. Nota-se, através da Tabela 3, que a fração HTP1 mostrou maior afinidade por L-leucina (142,5 U/mg) e L-metionina (136,5 U/mg), seguida de L-arginina (82,2 U/mg). L-triptofano (76,2 U/mg) e L-fenilalanina (58,2 U/mg). Aminoácidos como L-asparagina e L-serina apresentaram menor afinidade pela fração HTP1. O aminoácido L-prolina não sofreu oxidação pela fração. Uma unidade de enzima foi definida como a oxidação de 1 μ M de L-leucina por minuto.

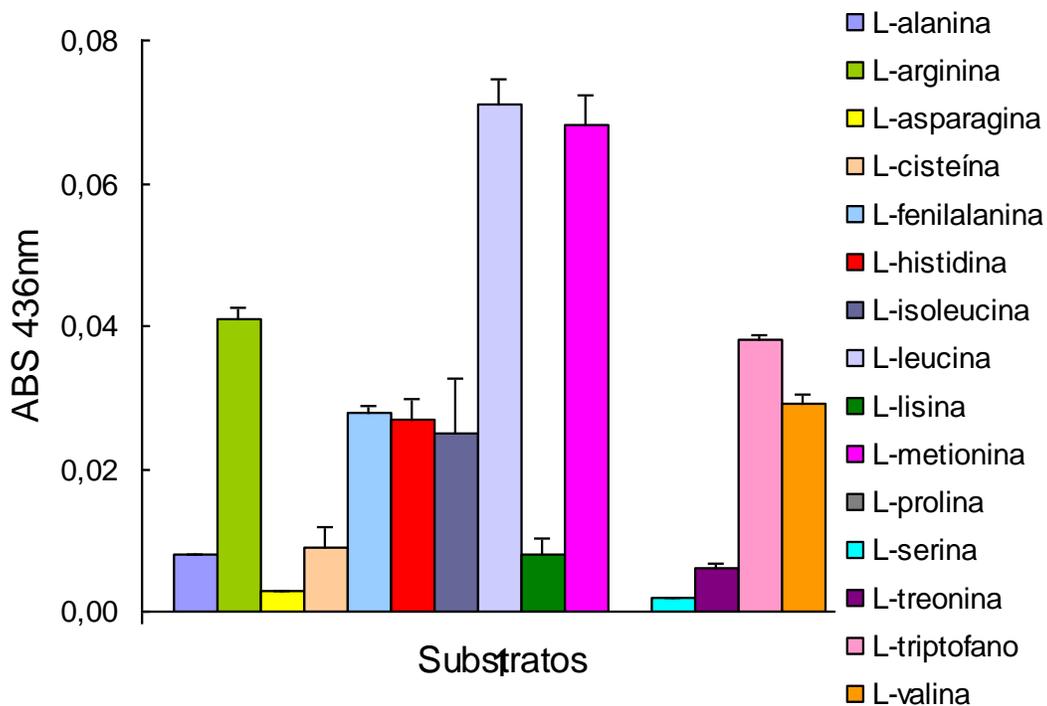


Figura 14: Atividade L-aminoácido oxidase da fração HTP1 sobre diferentes substratos. A fração HTP1 (2 µg) foi incubada com 50 µg/mL de peroxidase de rabanete, 100 µM de L-aminoácido, 10 µM de *o*-dianisidina, em 0,1 M de Tris-HCl pH 7,8 para um volume final de 1mL, por 30 minutos a 25°C, e a absorbância foi monitorada a 436nm.

Tabela 3: Cálculo da atividade específica da fração HTP1

Aminoácido	Atividade específica U/mg
L-Leucina	142,5
L-Metionina	136,5
L-Arginina	82,3
L-Triptofano	76,2
L-Fenilalanina	58,2
L-Valina	58,2
L-Histidina	54,1
L-Isoleucina	50,1
L-Cisteína	18,0
L-Lisina	16,0
L-Alanina	16,0
L-Treonina	12,0
L-Asparagina	6,0
L-Serina	4,0
L-Prolina	0

Uma unidade de atividade enzimática é definida como a oxidação de 1 μ M de L-leucina por minuto.

4.7 – Caracterização bioquímica e biológica da proteína P8 purificada na cromatografia de troca aniônica

Devido ao seu alto teor de pureza, foram realizados alguns ensaios bioquímicos com a proteína P8 purificada na cromatografia de troca aniônica (Fig. 7) e ensaio biológico, visando utilizar esta proteína para determinar a potência de soros de cavalo anti-botrópicos.

4.7.1 – Perfil protéico em SDS-PAGE da proteína P8

Através da figura 15 pode-se visualizar o perfil protéico da proteína P8 em condições não redutoras e redutoras. Na ausência de β -mercaptoetanol a proteína apresentou-se com uma massa molecular de aproximadamente 29,5 kDa, enquanto que em condições redutoras pode-se observar duas bandas de proteína com aproximadamente 15,8 kDa e 14,4 kDa. Esse resultado mostra que esta proteína é um heterodímero.

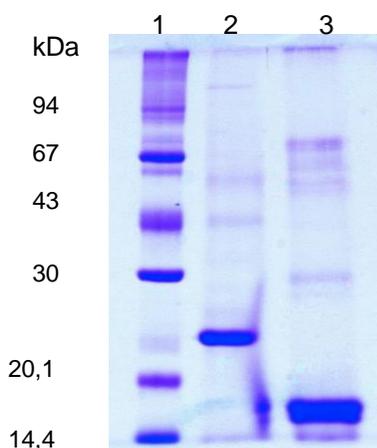


Figura 15: Gel de poliacrilamida com SDS da proteína P8 purificada. 1- padrão de peso molecular; 2- proteína P8 sem redução; 3- proteína P8 com redução. As amostras (20 μ g) foram fracionadas em gel de 12,5% e coradas com azul de Coomassie.

4.7.2 – Cromatografia de fase reversa da proteína P8

A figura 16 representa o perfil cromatográfico da proteína P8 repurificada e dessalinizada por cromatografia de fase reversa em sistema de HPLC. Através da coluna C18 a amostra foi eluída com aproximadamente 66% de acetonitrila, em um único pico.

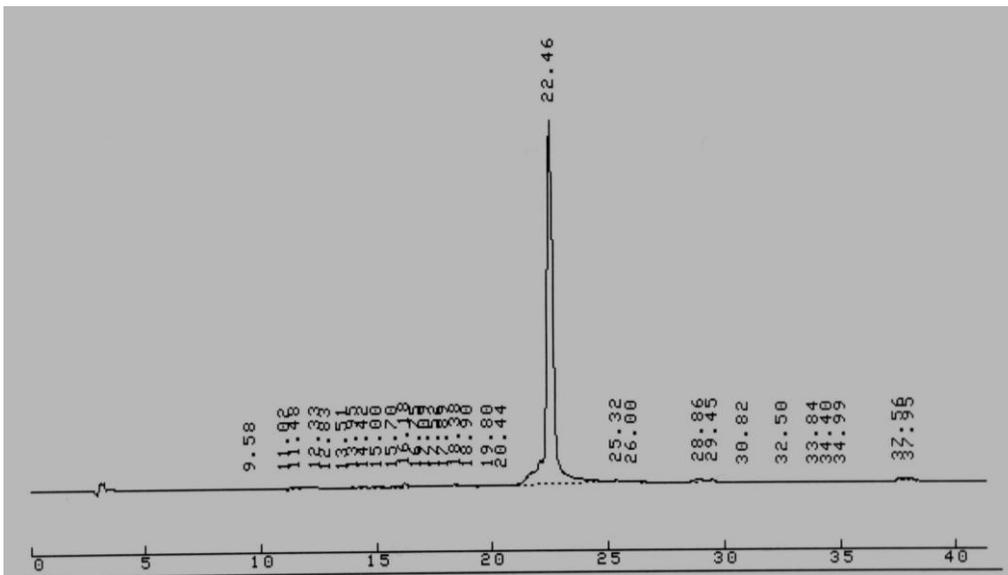


Figura 16: Perfil da cromatografia da proteína P8 (Fig. 5) em fase reversa (HPLC). Aplicou-se 80 μ g da proteína P8 na coluna C18 (Shimadzu) equilibrada com solução de TFA de 0,1% em água e eluída contra um gradiente linear da solução de TFA 0,1% e acetonitrila 80% (solução B) a um fluxo de 1,0 mL/min. Gradiente: 0-5 minutos: gradiente linear de 0 a 50% da solução B; 5-25 minutos: gradiente linear de 50 a 90% de solução B; 25,5-36 minutos: 100% de solução B. Atenuação 7.

4.7.3 – Análise por espectrometria de massa, redução e sequenciamento da proteína P8

Com base na figura 17, que representa o espectro de massas obtido da proteína P8 após fase reversa, pode-se verificar a presença de apenas uma espécie de molécula apresentando uma massa molecular de 30260,87 Da.

Tendo em vista o perfil de proteína obtido na corrida de SDS-PAGE (Fig. 15) a proteína P8 foi desnaturada, reduzida e alquilada como descrito em materiais e métodos. A figura 18 representa o perfil das duas subunidades (monômeros), uma sendo eluída com 62% de acetonitrila denominada de P8a e a outra P8b sendo eluída com 64% de acetonitrila.

Determinou-se a seqüência N-terminal de aminoácidos das duas subunidades separadamente pela técnica de degradação de Edman, automatizada. A confiabilidade das seqüências ocorreu até o vigésimo ciclo. A Tabela 4 representa o alinhamento das seqüências das subunidades da proteína P8 com proteínas obtidas pelo banco de dados (NCBI).

Como as subunidades da proteína P8 apresentaram um alto grau de homologia com as cadeias α e β da botrocetina, 100% e 90% respectivamente (Tab. 3), realizou-se o cálculo da massa média da botrocetina. O cálculo foi realizado por uma planilha da Microsoft levando em consideração a massa média de cada aminoácido, o número de ligações dissulfetos, e a porção C-terminal carboxilada, partindo da seqüência primária obtida por USAMI *et al.* (1993). A comparação das massas médias calculadas e da massa média observada está representada na Tabela 5. Nota-se que a proteína P8 possui uma massa média com 23 kDa a mais que a massa média da botrocetina.

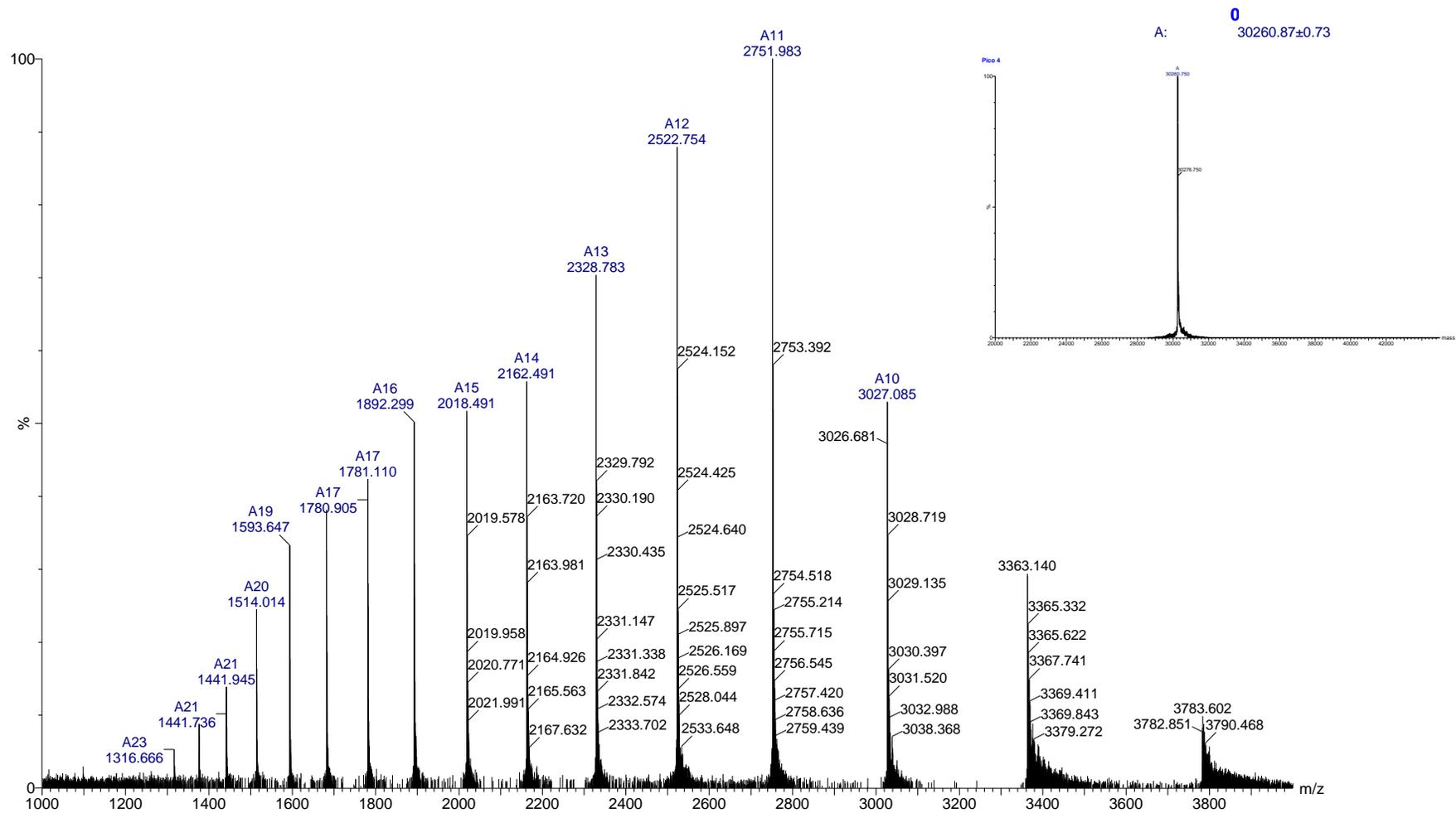


Figura 17: Espectrometria de massa da proteína P8.

A amostra foi ressuspensa em 50% de acetonitrila e 0,1% de TFA (v/v). A fonte de ionização foi operada em modo positivo.

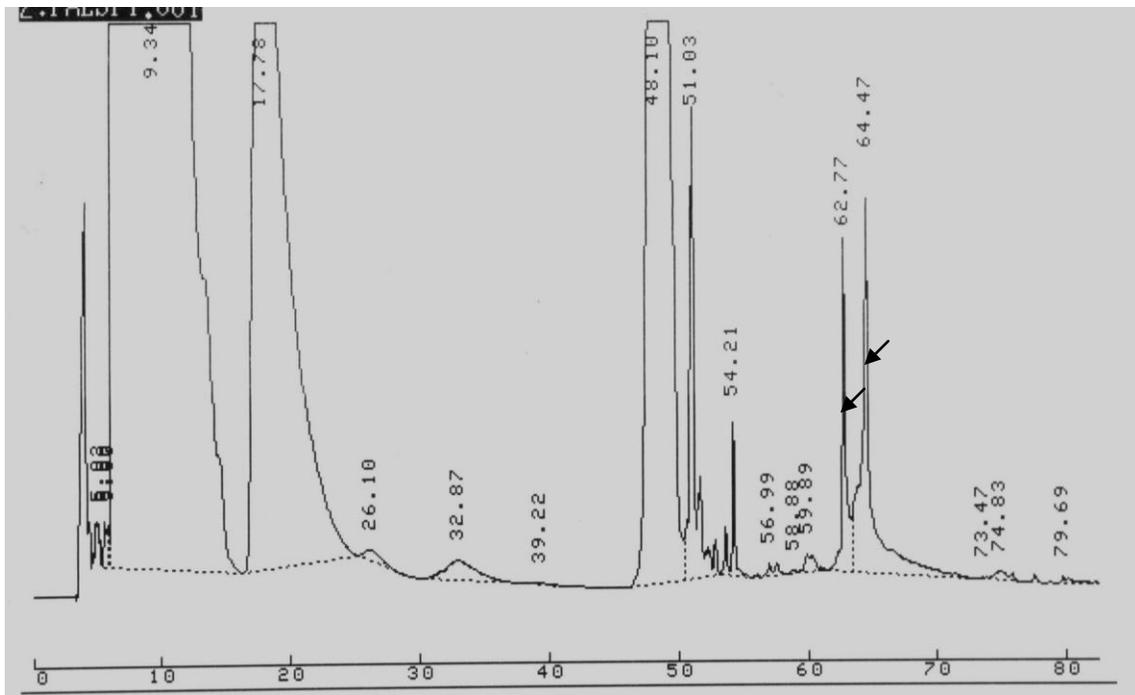


Figura 18: Perfil cromatográfico em fase reversa da proteína P8, após redução e alquilação. A proteína P8 (80 μ g), reduzida e alquilada foi aplicada em coluna de fase reversa C18 (Shimadzu) equilibrada com solução de TFA de 0,1% em água (solução A) e eluída contra um gradiente linear da solução de TFA 0,1% e acetonitrila 80% (solução B) a um fluxo de 1,0 mL/min. Gradiente: 0-40 minutos: solução A; 40-80 minutos: gradiente linear de solução B. As setas representam as subunidades P8a e P8b, sendo identificadas pelo não aparecimento no branco (guanidina 6 M em Tris-HCl 0,6 M pH 8,6, 2-mercaptoetanol e 4-vinilpiridina).

Tabela 4: Comparação da seqüência de aminoácidos da região N-terminal das subunidades P8a e P8b com outras proteínas

Proteína	Seqüência	Identidade (%)	Referência
Subunidade P8a ¹	DCPSGWSSYEGNCYKFFQQK	100	Este trabalho
Cadeia α -botrocetina ²	DCPSGWSSYEGNCYKFFQQK	100	USAMI <i>et al</i> , (1993)
Subunidade β de CHH-B ³	DCPSDWSSYEGHCYRVFQQE	75	ANDREWS <i>et al.</i> , (1996)
Cadeia β de agretina ⁴	DCPSGWSSYEGHCYKPFNEP	75	CHUNG <i>et al</i> , (1999)
Subunidade β de agkicetina ⁵	DCPSDWSSYEGNCYLVVKEK	70	CHEN & TSAI, (1995)
Subunidade P8b ¹	XCPPDWSSYEGHCYRFFKKEE	100	Este trabalho
Cadeia β -botrocetina ²	DCPPDWSSYEGHCYRFFKEW	90	USAMI <i>et al</i> , (1993)
Subunidade B CHH-B ³	DCPSDWSSYEGHCYRVFQQE	75	ANDREWS <i>et al.</i> , (1996)
Alboagregina A ⁶	DCPSDWSSYEGHCYRVFNPEP	75	KOWALSKA <i>et al.</i> , (1998)
Cadeia α -bitiscetina ⁷	GCLPDWSSYKGHICYKVFKKV	65	MATISUI <i>et al.</i> , (1997)

Proteínas purificadas dos venenos: 1 e 2- *B. jararaca* 3- *C. horridus horridus* 4- *Calloselasma rhodostoma* 5- *Agkistrodon acutus* 6- *Trimeresurus albolabris* 7- *Bitis arietans*. Identidade foi definida como a porcentagem de aminoácido iguais ao N-terminal das subunidades P8a e P8b.

Tabela 5: Comparação entre a massa média observada da proteína P8 e as massas médias calculada e observada da botrocetina.

Proteína	Massa média calculada (Da)	Massa média observada (Da)
Proteína P8	-	30260,87 ^a
Botrocetina	30237,94 ^b	27000,00 ^c

Nota: a- massa média observada por espectrômetro demassa ESI-Q-TOF Micro. b- massa média calculada com base na seqüência primária observada por USAMI *et al.* (1993). c- massa observada por SDS-PAGE por FUJIMURA *et al.*, (1991).

4.7.4 – ELISA: determinação da potência de antivenenos

A proteína P8 foi utilizada como antígeno na realização de ensaios de ELISA indireto com o objetivo de implantar um teste capaz de diferenciar a potência neutralizante de antivenenos botrópicos.

A figura 19 representa a correlação entre os títulos de anticorpos obtidos por ELISA e a capacidade neutralizante do antiveneno. Obteve-se uma boa correlação entre estes parâmetros, sendo a proteína P8 capaz de distinguir entre antivenenos com potência menores e maiores que 5. Os antivenenos com potências menores que 5 apresentaram um título de anticorpo abaixo de 0,475 nm, enquanto o título observado para os antivenenos com potência maior que 5 foram superior a 0,690 nm. O antiveneno de potência 5, onde 1 mL de antiveneno é capaz de neutralizar 5mg de veneno total, apresentou uma titulação em torno de 0,600 nm.

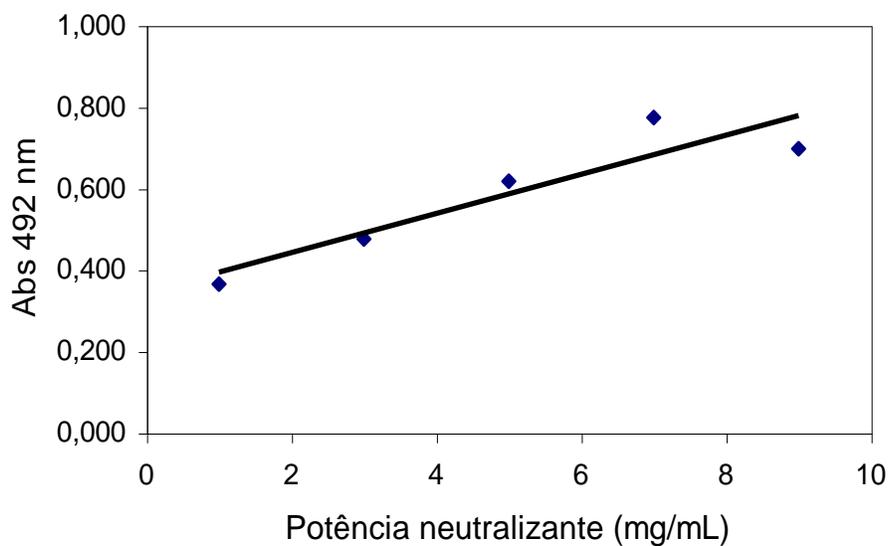
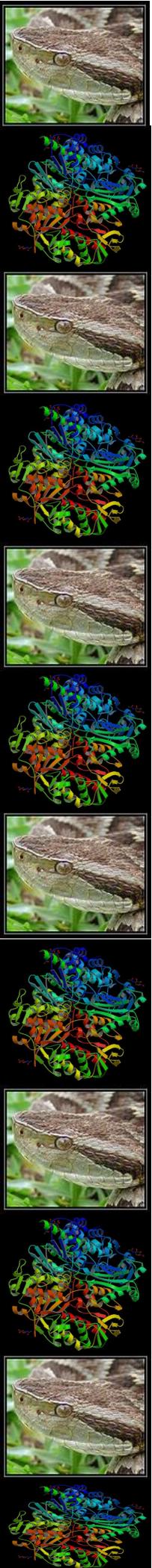


Figura 19: Correlação entre os níveis de anticorpos medidos por ELISA e as potências neutralizante de antivenenos botrópicos. A placa foi sensibilizada com 100 ng/well da proteína P8 e os antivenenos de cinco potências diferentes (potência 1, 3, 5, 7 e 9) foram utilizados na diluição de 1:500. A potência neutralizante foi definida como a quantidade de veneno (mg) neutralizado por 1 mL de antiveneno. Os dados obtidos foram a média de três experimentos.



5 – Discussão

Muitos trabalhos científicos têm sido realizados no sentido de descobrir novos compostos biológicos que possam ser utilizados pela indústria farmacêutica. Visando tanto a descoberta de novos fármacos, quanto a melhoria de metodologias de diagnóstico e a produção das drogas. Os venenos de animais peçonhentos são uma rica fonte de compostos protéicos e não protéicos que apresentam inúmeras atividades farmacológicas, e de onde cada vez mais estão sendo isolados proteínas e peptídeos que podem criar novos caminhos na farmacopéia.

No presente trabalho testaram-se vários venenos de animais peçonhentos na tentativa de descobrir algum que fosse capaz de inibir o crescimento bacteriano, para posterior fracionamento do mesmo e isolamento de compostos com tal capacidade. Dentre os venenos ensaiados, os do gênero *Bothrops* apresentaram atividade antibacteriana contra *S. aureus*. Venenos como da abelha *A. mellifera*, da aranha *Lycosa* sp, do escorpião *T. serrulatus*, e da serpente *C. durissus terrificus*, não comportaram-se como antibacteriano. STILES *et al.*, (1991) ensaiaram 30 diferentes venenos de serpente quanto a atividade antibacteriana e observaram que venenos das famílias Elapidae e Viperidae apresentaram tal atividade. No mesmo estudo, o veneno da serpente *C. durissus terrificus* apresentou atividade negativa, porém outras espécies do mesmo gênero foram ativas contra *S. aureus* e *E. coli*. A razão para tal acontecimento foi atribuída ao fato dos venenos serem oriundos de regiões diferentes, onde as espécies podem apresentar o veneno com coloração amarela ou branca. Tal fato pode explicar também a não atividade do veneno crotálico neste trabalho, uma vez que o mesmo apresentava coloração branca. A cor amarela do veneno sugere a presença da enzima LAO e de seu cofator FAD (TU, 1982 *apud* JOHNSON *et al.*, 1987). Ao contrário do observado neste trabalho, a propriedade antibacteriana foi verificada no veneno da abelha *A. mellifera*, atribuída a um peptídeo de 2800 Da,

mais ativo contra bactérias gram-positivas que gram-negativas (FENNEL *et al.*, 1968 *apud* STILES *et. al*, 1991) e um peptídeo anfipático purificado do veneno da aranha *L. carolinensis* que inibiu o crescimento de *E. coli* (YAN & ADAMS, 1998). Recentemente SANTOS, 2004 purificou uma fração do veneno de *L. erythrognatha*, ativo contra *S aureus*. Estes achados discordam com os resultados, talvez pelo fato de terem sido realizados com proteínas purificadas o que leva a uma maior concentração do produto ativo.

A diferença no poder antibacteriano encontrado entre os venenos botrópicos, onde os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* mostraram um maior halo de inibição, pode ser explicado pela diferença de composição protéica dos venenos. Dentre outros fatores, esta variação pode ser dependente da idade e de fatores geográficos (MEIER, 1986 & SCHENBERG, 1963). PESSATTI *et al.*, 1995 demonstraram uma maior atividade LAO no veneno de *B. neuwiedii* da Amazônia (655,97 U/mL), enquanto *B. jararaca* e *B. jararacussu* provenientes da região sudeste apresentaram 314,95 e 391,87 U/mL respectivamente. O mesmo foi observado por TAN & PONNUDURAI (1991), encontrando maior atividade LAO em *B. neuwiedii*, além de uma variação entre indivíduos da espécie *B. jararaca*. Levando-se em consideração que o fator antibacteriano está relacionado com atividade LAO, como será discutido adiante, os resultados encontrados neste trabalho contradiz o observado pelos autores, uma vez que o veneno de *B. neuwiedii* apresentou-se com a menor atividade antibacteriana.

Ao ensaiar o veneno bruto de *B. jararaca* e *B. jararacussu* contra diferentes espécies de bactérias verificou-se um amplo espectro de atividade, estes agiram contra bactérias gram-positivas e gram-negativas. Nove dos venenos elapídeos testados por STILES *et al.* (1991) não apresentaram nenhuma ação significativa contra *P. aeruginosa* e *E. coli* e apenas uma ação moderada contra *B. subtilis*. A susceptibilidade dos venenos viperídeos foram em ordem decrescente de ação

em; *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa* e *E. coli.*, sendo que esta última foi sensível apenas a 3 dos 8 venenos testados. Tais fatos corroboram com os experimento de susceptibilidade deste trabalho, onde também a bactéria gram-negativa *E. coli* resistiu a inibição pelos venenos brutos, e *S. aureus* (gram-positiva e catalase positiva), e *P. aeruginosa* (gram-negativa) foram susceptíveis aos venenos. Venenos de serpentes como *Causus rhombeatus*, *B. gabonica*, *Naja mossambica* mostraram atividade antibacteriana contra *S. aureus*, *B. subtilis*, *P. aeruginosa*, *Clostridium sordellii* e *C. perfringens* (BLAYLOCK, 2000). Um plantel de oito miotoxinas (isoformas de fosfolipases) expressou ação antibacteriana contra *S. aureus* e *S. typhimurium* (SANTAMARÍA *et al.*, 2004). Esta última bactéria também foi sensível aos venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.

O veneno de *B jararaca* ao ser fracionado por cromatografia de gel filtração, resultou em seis frações, sendo que a primeira fração apresentou atividade antimicrobiana. Segundo MARIA *et al.* (1998) ao fracionar o veneno bruto desta mesma serpente em coluna Sephadex G-100, esta primeira fração apresentou componentes tóxicos e letais, quando injetadas intraperitonealmente em camundongos. STILES *et al.* (1991) ao realizar testes de letalidade em camundongos com as proteínas antimicrobianas LAO1 e LAO2 de *P. australis* não observou nem morte dos camundongos e nem atividade proteolítica. No mesmo trabalho os autores observaram que as proteínas LAO1 e LAO2 apresentam sua propriedade antibacteriana associada com atividade LAO. O referido trabalho acima condiz com os resultados obtidos, onde a atividade antimicrobiana da fração HTP1 da cromatografia por afinidade a heparina, e todas as outras frações de processos cromatográficos anteriores também correlacionaram com a atividade LAO. Segundo STÁBELI *et al* (2004) o componente do veneno da serpente *B. alternatus* que apresenta atividade contra *E. coli* e *S. aureus* e induz agregação de

plaqueta é uma LAO apresentando massa molecular de 66 kDa em gel de poliacrilamida e 123 kDa em cromatografia de gel filtração.

Proteínas com atividade LAO têm sido extensamente estudadas por diversos grupos de pesquisa, que buscam elucidar o seu papel funcional nos venenos das serpentes. Para tal propósito vem se fazendo uso de diferentes processos de purificação. A fração HTP1 foi purificada através de três processos cromatográficos, tendo ao final um rendimento de 1% e o fator de purificação foi de 0,90 baseado na atividade LAO, esta fração equivale a 1,1% do veneno bruto. FUJIMURA *et al.* (2001) purificaram a proteína M-LAO inibidora de agregação de plaqueta do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* através de cinco processos cromatográficos, utilizou as colunas DEAE-Sepharose CL-6B, Heparin-Sepharose CL-6B, Sephacryl S-300, Phenyl-Sepharose HT, e Hydroxyapatite HT. ALI *et al.* (2000) purificaram a enzima LAO do veneno da *Eristocophis macmahoni* através de um único passo usando coluna de fase reversa Nucleosil 7C18. Essa proteína apresentou várias atividades biológicas como hemolítica, formadora de edema e indutora de agregação de plaqueta. Ao final da purificação da enzima do veneno da serpente *L. muta muta*, SÁNCHEZ & MAGALHÃES (1991) obtiveram um rendimento de 38,4% de proteína. Tamanha discrepância ao comparar o rendimento registrado por estes autores e o aqui obtido, pode ser explicado pela variação na composição dos venenos, e pela possibilidade de perda de material que possa ter ocorrido, por desnaturação da proteína ou por falha na coleta.

Ao final dos processos de purificação utilizados obteve-se uma fração antimicrobiana que apresentou três bandas protéicas em gel de poliacrilamida em condições não redutoras, que podem ou não ser isoformas da mesma enzima, principalmente se levar em consideração que o trabalho foi realizado com um “pool” de venenos de indivíduos de *B. jararaca*. Esta hipótese veio à tona após termos submetido esta fração a cromatografia de fase reversa e o perfil de eluição

ter apresentado um único pico (dado não mostrado), o que mostra que o grau de hidrofobicidade delas é exatamente o mesmo. De acordo com HAYES & WELLNER (1969) o perfil eletroforético da LAO cristalina, obtida de um “pool” de venenos individuais de *C. adamateus*, apresentou três bandas enzimaticamente ativas com diferentes massas moleculares, chamadas de A, B e C, e cada uma desta ao ser submetida a eletrofocalização apresentou de 5 a 7 componentes. No mesmo trabalho os autores demonstraram que essas isoformas variam entre os indivíduos da mesma espécie, ou seja, um indivíduo pode apresentar apenas uma isoforma enquanto o outro pode apresentar até as três. CURTI *et al* (1968) ao realizarem estudos sobre processo de inativação desta mesma enzima, verificaram que as formas ativa e inativa apresentam as mesmas três bandas de proteínas. A presença de isoformas também é confirmada pela observação de diferentes massas moleculares encontradas entre enzimas isoladas de diferentes espécies. MASUDA *et al.* (1997) isolaram a enzima do veneno de *C. atrox*, o qual apresentou uma massa molecular de 60 kDa em SDS-PAGE e 110 kDa em gel filtração. Enquanto AHN *et al.* (1997) encontraram uma LAO com massa molecular de 70 kDa em condições não redutoras por SDS-PAGE e 150 kDa por cromatografia de gel filtração. A seqüência N-terminal da proteína K-LAO do veneno de *Naja naja kaouthia* revelou alto grau de similaridade com outras L-aminoácido oxidase de venenos. JIMBO *et al.* (2003) purificaram uma L-aminoácido oxidase da glândula da *Aplysia kurodai* composta de quatro subunidades idênticas com 85 kDa.

O veneno bruto e a fração HTP1 apresentaram atividade antiparasitária contra formas promastigota de *L. l. amazonensis* e atividade hemolítica, provocando lise parcial nas hemácias de cavalo. Estudos anteriores demonstraram a inibição do crescimento de *T. cruzi* e de formas promastigotas de *L. major* pelo veneno bruto de *B. jararaca* (GONÇALVES *et al*, 2002). Pouco

antes, TEMPONE *et al.* (2001) verificaram a atividade anti-*Leishmania* no veneno bruto de *B. moojeni* e, partindo para a purificação do mesmo encontraram uma proteína ativa com massa molecular em torno de 69 kDa em SDS-PAGE e 140 kDa por cromatografia de gel filtração. Esta proteína apresentou atividade LAO. A atividade anti-*Leishmania* da fração HTP1 está diretamente relacionada com a quantidade de aminoácidos livres no meio de cultura, ao cultivar as promastigotas em meio pobre de aminoácidos (HBSS completo) observou-se elevada viabilidade celular, o que não aconteceu no meio rico em aminoácidos, mostrando assim, a necessidade de substrato para a atividade LAO.

A atividade hemolítica da enzima LAO tem sido pouco explorada, ALI *et al.* (2000) observou atividade hemolítica do veneno bruto e da enzima purificada LNV-LAO, em hemácias de carneiro. A enzima LNV-LAO também promoveu apoptose em células humanas, caracterizada pela fragmentação do DNA, apesar de não induzir letalidade em camundongos. No ensaio hemolítico, deste trabalho, a fração P1 da cromatografia de gel filtração mostrou-se com pouca atividade, o que pode ser explicado pelo armazenamento da amostra por um período de 8 meses a temperatura de -20°C . De acordo com CURTI *et al.* (1968), a LAO de *C. adamanteus* é inativada pela estocagem em temperaturas entre -5° e -60°C , com o máximo de inativação observada em torno de -20°C .

A L-aminoácido oxidase é uma flavoenzima que catalisa a desaminação oxidativa de L-aminoácidos para gerar α -ceto aminoácido, com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. Com a adição de catalase, uma enzima capaz de degradar o H_2O_2 , juntamente com a fração HTP1 nos ensaios, observou-se perda das atividades antimicrobianas, antiparasitária e hemolítica. Indicando que o peróxido de hidrogênio, um dos produtos gerados na reação enzimática da LAO, está envolvido no processo ativo. Tal resultado está de acordo com EHARA *et al.* (2002) que relataram a inibição da atividade antibacteriana de achacina (LAO) por

várias enzimas degradativas do H_2O_2 . As células de *L. I. amazonensis* permaneceram viáveis após incubação com L-AAO (*B. moojeni*) e catalase (TEMPONE *et al.* 2001). Catalase e superóxido dismutase fazem parte do mecanismo de defesa de *Leishmania* spp, porém as formas promastigotas apresentam uma deficiência na produção destas enzimas, levando à morte de 80 a 95% pelo H_2O_2 produzido por macrófagos (MEHLOTRA, 1996 *apud* TEMPONE *et al.*, 2001). A enzima OHAP-1 (*Trimeresurus flavoviridis*) perdeu a capacidade apoptótica após a adição de antioxidantes como catalase e glutatona reduzida (SUN *et al.*, 2003). O mesmo aconteceu com apoxin I (*C. atrox*) (TORRI *et al.*, 1997). A perda da atividade de agregação de plaquetas da enzima TM-LAO (LAO de *T. mucrosquamatus*) foi conferida à catalase (WEI *et al.*, 2002). Ao marcar a enzima LAO com um cromóforo, SUHR & KIM (1996) observaram que esta interage com a superfície das células, o que poderia levar ao aumento local da concentração de H_2O_2 gerado.

O H_2O_2 é uma espécie reativa do oxigênio (ROS) que atravessa facilmente as membranas biológicas, sendo tóxico para vários microorganismos diretamente, promovendo várias oxidações ou indiretamente formando mais espécies reativas como o radical hidroxil. Os ROS promovem a oxidação de proteínas, fazendo com que estas percam suas funções biológicas, oxidação de lipídeos de membrana e de DNA, o que pode levar ao processo de apoptose (SORG, 2004). Assim, pode se sugerir que a fração HTP1 (com atividade LAO) é um bactericida indireto, ou seja, age promovendo a morte das bactérias via um produto da sua reação enzimática. A capacidade das células resistirem à essa enzima pode ser considerada pela sua capacidade de produzir antioxidantes suficientes para degradar o H_2O_2 , ou então à fraca interação enzima-proteína de membrana celular, diminuindo a concentração local da LAO. Alguns estudos estão sendo realizados visualizando a oxidação de células vermelhas do sangue por ROS.

Embora as hemácias possuam um grande sistema antioxidante, ROS produzidos de forma endógena ou exógena promovem danos oxidativos nas proteínas e lipídeos de membrana, levando à senescência das células normais (SHINAR & RACHMILEWITZ, 1990 *apud* NAGABABU *et al.*, 2003). Em processos patológicos foi observado que os antioxidantes produzidos pelas hemácias não são capazes de remover completamente os ROS (CLARK, 1988 *apud* NAGABABU *et al.*, 2000). BERNARD & STINSON (1996) verificaram que a α -hemolisina produzida pela bactéria *S. gordonii* é o H_2O_2 , e que este promoveu a formação de um halo esverdeado ao redor da colônia devido a oxidação do heme da hemoglobina. NAGABABU & RIFKIND (1998) demonstraram que o peróxido de hidrogênio degrada o motivo heme da oxihemoglobina, produzindo dois compostos fluorescentes.

A fração HTP1 mostrou-se com maior afinidade pelos aminoácidos L-leucina e L-metionina, seguido de L-arginina, L-triptofano e L-fenilalanina. Nenhuma atividade foi observada com a utilização de L-prolina como substrato. O espectro de atividade desta fração foi muito amplo, sendo capaz de oxidar aminoácidos básicos, polares e hidrofóbicos. Estes resultados estão de acordo com PESSATTI *et al.* (1995) onde L-metionina e L-leucina foram os substratos mais oxidados pela LAO de *B. cotiara*. O mesmo foi observado por EHARA *et al.* (2002) tendo o triptofano como terceiro substrato mais oxidado. Por outro lado, JIMBO *et al.* (2003) visualizou uma maior geração de H_2O_2 usando L-arginina e L-lisina como substrato, a oxidação de L-leucina e L-metionina equivaleu a aproximadamente 5% da atividade sobre L-arginina. Tal variação na especificidade pelo substrato pode ser hipotetizado por possíveis diferenças na seqüência de aminoácidos no sítio ativo da enzima.

Estudos de concentração inibitória mínima e ensaios *in vivo* tornam-se necessários para avaliar a possibilidade da utilização desta fração que apresenta

atividade LAO, como um antibacteriano e antiparasitário efetivamente. Segundo SORG (2004) os microorganismos são muito mais sensíveis aos ROS que os tecidos humanos, existindo uma janela bactericida onde concentrações de ROS suficientes para matar bactérias podem não causar danos ao tecido do hospedeiro.

Após cromatografia de gel filtração e troca aniônica obteve-se a purificação de uma proteína com alto teor de pureza do veneno bruto de *B. jararaca* (proteína P8). Tal proteína, que não apresentou atividade antibacteriana e LAO, mostrou uma massa média de 30260,87 Da em espectrômetro de massa ESI-Q-TOF Micro. A análise em gel de poliacrilamida mostrou ser um heterodímero que apresenta uma massa de 26 kDa antes da redução e após a quebra das ligações dissulfeto uma subunidade de 15,5 kDa e outra com 14,8 kDa. A partir da determinação e do alinhamento da seqüência N-terminal das duas subunidades (P8a e P8b) com outras proteínas foi possível observar um alto grau de identidade com proteínas tipo-lectina tipo-C. O maior grau de homologia foi com a botrocetina, apresentando 100% de homologia entre a subunidade P8a com a cadeia α da botrocetina e 90% de homologia entre a subunidade P8b e a cadeia β da botrocetina. FUJIMURA *et al.* (1991) purificaram a botrocetina de duas cadeias do veneno de *B. jararaca* com a utilização de três processos cromatográficos, começando por uma coluna de troca iônica, seguida por gel filtração e interação hidrofóbica em HPLC, ainda para análise de aminoácidos purificaram em fase reversa. Análises revelaram que sua massa aparente em SDS-PAGE é de 27 kDa antes e de 15/14,5 kDa após redução. Esta proteína promove aglutinação de plaquetas, formando um complexo ativo com o fator de von Willebrand induzindo a ligação deste fator a glicoproteína Ib.

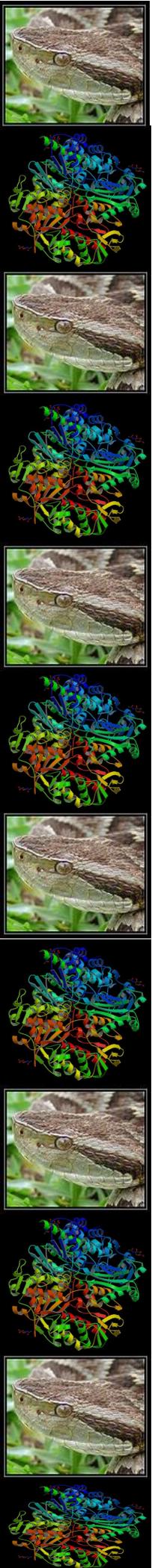
Outras proteínas agonistas de agregação de plaquetas homólogas à proteína P8 são agretina purificada do veneno de *Calloselasma rhodostoma*

(CHUNG *et al.*, 1999), alboagregina de *T. albolabiris* (KOWALSKA *et al.*, 1998) e, bitiscetina de *Bitis arietanse* (MATISUI *et al.*, 1997). Ao contrário da botrocetina a proteína CHH-B é um antagonista da agregação de plaqueta, liga-se à glicoproteína Ib inibindo a ligação do fator de von Willebrnd (ANDREWS *et al.*, 1996). Existe uma grande variação na seqüência das proteínas tipo lectina tipo C, o que leva a diferentes interações com receptores ou domínios de receptores da superfície das plaquetas.

Pode se dizer que a proteína P8 representa uma isoforma da botrocetina pelo fato de serem provenientes do mesmo veneno, apresentando um alto grau de homologia N-terminal, porém terem uma significativa alteração entre suas massas moleculares. O aumento da massa molecular da proteína P8 em 23 Da, pode significar tanto a alteração de um único aminoácido quanto de vários aminoácido ao longo da seqüência. O local e quais os aminoácidos alterados só podem ser confirmados pelo sequenciamento completo da molécula. A variação na seqüência primária da proteína pode ou não levar a uma alteração funcional da molécula, hipótese não ensaiada no presente estudo.

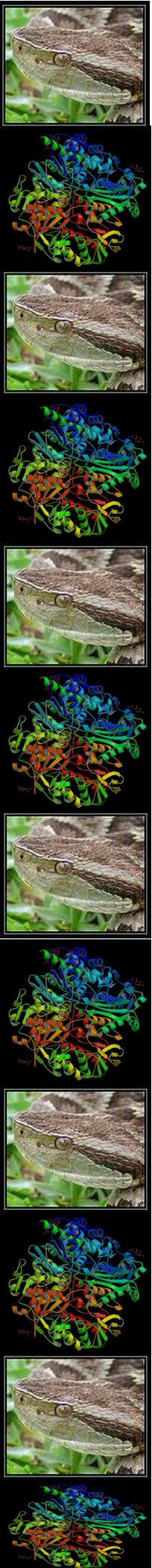
A proteína P8 foi utilizada como antígeno em ensaios de ELISA para diferenciação da potência neutralizante de antivenenos botrópicos. Um passo importante no desenvolvimento de antivenenos são os testes pré-clínicos utilizando ensaios *in vivo* para determinação da capacidade neutralizante do antiveneno. Porém estes procedimentos são extremamente laboriosos, caros, consomem grande tempo de trabalho e muitas vezes reproduzem resultados variáveis, além de promoverem a morte de um grande número de camundongos. Estudos têm sido realizados na tentativa de substituir essa rotina *in vivo* por ensaios *in vitro*. THEAKSTON & REID (1979) relataram o uso de ELISA com veneno bruto como antígeno para ensaiar potência de antivenenos viperideos e elapideos. Estudos de correlação entre os níveis de anticorpos e a potência

neutralizante de antivenenos de *B. jararaca* foram realizados por MARIA *et al* (1998), porém com a utilização da fração tóxica do veneno de *B. jararaca*. Nenhuma correlação foi encontrada entre a potência do antiveneno e os títulos de ELISA contra as frações não tóxicas. No presente trabalho, ao utilizar a proteína P8 como antígeno para diferenciar a potência neutralizante de antivenenos obteve-se uma boa correlação entre a capacidade neutralizante de letalidade do antiveneno e o título de anticorpos. Com a utilização do método de ELISA foi possível observar diferenças nos títulos de anticorpos entre os antivenenos de potência abaixo de 5 e os antivenenos de potência acima de 5. Segundo a Organização Mundial de Saúde, apenas o soro que possui potência acima de 5 pode ser processado para purificação de imunoglobulinas para uso terapêutico. Nos ensaios realizados por ALAPE-GIRON *et al.* (1997) os antivenenos foram titulados também por ELISA contra o veneno bruto de *M. nigrocinctus* e duas toxinas purificadas do mesmo, porém nenhuma correlação foi encontrada entre eficácia de proteção e os títulos obtidos no teste de ELISA. Os resultados obtidos no presente estudo indicam que ELISA, usando a proteína P8 purificada do veneno de *B. jararaca* como antígeno, pode ser utilizada como uma técnica *in vitro* para medir a potência de antivenenos botrópicos, durante o processo de imunização do cavalo.



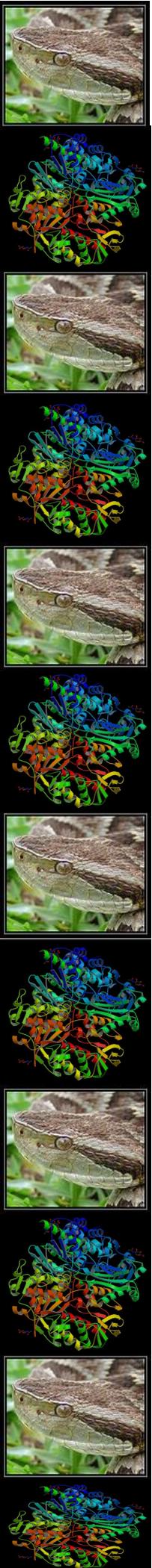
6 – Conclusões

- Os venenos botrópicos: *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. moojeni* e *B. neuwiedi*, apresentam atividade contra a bactéria gram-positiva *S. aureus*. Os venenos de *B. jararaca* e *B. jararacussu* são mais ativos contra esta bactéria.
- Algumas bactérias gram-positivas e gram-negativas foram susceptíveis ao veneno bruto de *B. jararaca* e *B. jararacussu*.
- A partir do veneno da serpente *B. jararaca* foi purificada a fração com atividade antimicrobiana HTP1 que apresenta três bandas protéicas em SDS-PAGE, com pesos estimados de 80 kDa, 60,8 kDa e 48,1 kDa.
- A atividade antimicrobiana da fração HTP1 e das frações de processos cromatográficos anteriores é correlacionada com a atividade L-aminoácido oxidase.
- A fração HTP1 também apresenta atividade anti-*Leishmania* e hemolítica.
- As atividades biológicas da fração HTP1 são mediadas pela produção de peróxido de hidrogênio e pela disponibilidade de L-aminoácido no meio.
- A fração HTP1 mostrou-se capaz de oxidar uma certa variedade de substratos, sendo mais específica para os aminoácidos L-leucina e L-metionina.
- Através de dois processos cromatográficos foi possível a purificação da proteína P8, um heterodímero com massa molecular média de 30260,87 Da e que apresenta alto grau de identidade com proteínas tipo lectina tipo C.
- A proteína P8 mostra-se como um bom antígeno para ser utilizado em ensaios de ELISA para correlacionar títulos de anticorpos e potência neutralizante de antivenenos botrópicos.



7 – Perspectivas

- Verificar se as proteínas contidas na fração HTP1 são realmente isoformas da enzima L-aminoácido oxidase, através do sequenciamento das proteínas via transferência para membrana de PVDF.
- Realizar ensaios de atividade L-aminoácido oxidase em gel de poliacrilamida nativo.
- Purificar as proteínas contidas na fração HTP1 para melhor caracterização bioquímica das mesmas.
- Calcular a dose inibitória mínima do veneno bruto e da proteína purificada em relação a atividade antibacteriana e antiparasitária.
- Realizar ensaios de toxicidade em camundongos, e ensaios que visem o cálculo da ação antibacteriana *in vivo*.
- Realizar ensaios de citotoxicidade em células de mamífero e estudar com mais detalhes o modo de ação desta L-aminoácido oxidase.
- Em relação à proteína P8, determinar a massa molecular das duas subunidades separadamente por espectrometria de massa.
- Determinar a diferença na seqüência de aminoácidos da proteína P8 com a botrocetina.
- Realizar ensaios de determinação de potência com um maior número de antivenenos.



8 – Referências Bibliográficas

- AHN, M. Y, LEE, B. M. & KIM, Y. S. (1997) Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Int J Biochem Cell Biol.* **29**:911-9.
- AIRD, S. D. (2002) Ophidian envenomation strategies and the role of purines. *Toxicon.* **40**:335-93.
- ALAPE-GIRON, A.; MIRANDA-ARRIETA, K.; CORTES-BRATTI, X.; STILES, B. G. & GUTIÉRREZ, J. M.(1997) A comparison of *in vitro* methods for assessing the potency of therapeutic antisera against the venom of the coral snake *Micrurus nigrocinctus*. *Toxicon* **35**:573-581.
- ALI, S. A; STOEVA, S; ABBASI, A; ALAM, J. M; KAYED, R.; FAIGLE, M; NEUMEISTER, B. & VOELTER, W. (2000) Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from leaf-nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) snake venom. *Arch Biochem Biophys.* **384**:216-26.
- ANDREWS R. K., KROLL M. H, WARD C. M, ROSE J. W, SCARBOROUGH R. M, SMITH A. I, LOPEZ J. A & BERNDT M. C. (1996) *Biochemistry*.**35**:12629-39.
- ARAÚJO, F. A. A; SANTALÚCIA, M. & CABRAL, R. F. (2003). Epidemiologia dos acidentes por animais peçonhentos. *In*: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD Jr., V. (Eds.) *Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. FAPESP, Ed. Sarvier, São Paulo, 468p.
- BERNARD, J. P. & STINSON, M. W. (1996) The alpha-hemolysin of *Streptococcus gordonii* is hydrogen peroxide. *Infection and Immunity* **64**:3853-57.
- BJARNASON, J. B. & TU, A. T. (1978) Hemorrhagic toxins from Western diamondback rattlesnake (*Crotalus atrox*) venom: Isolation and characterization of five toxins and the role of zinc in hemorrhagic toxin. *Biochemistry* **17**, 3395-3404.

- BLAYLOCK, R. S. (2000) Antibacterial properties of KwaZulu natal snake venoms. *Toxicon* **38**:1529-34.
- BOCHNER, R. & STRUCHINER, C. J. (2003) Epidemiologia dos acidentes ofídicos nos últimos 100 anos no Brasil: uma revisão *Cad. Saúde Pública* **19**:7-16
- BRADFORD, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantification of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Analytical Biochemistry*, **72**, 248-25.
- BRASIL. (1998) *Manual de diagnóstico e tratamento dos Acidentes por Animais Peçonhentos*. Brasília: Ministério da Saúde. Fundação Nacional da Saúde, 131p.
- CARDOSO, J. L. C. (1985) Snake bites at Hospital Vital Brazil – a study of 2908 cases. *Toxicon* **23**:558-562.
- CARNEIRO, A. S.; RIBEIRO, O. G.; DE FRANCO, M; CABRERA, W. H. K.; VORRARO, F.; SIQUEIRA, M.; IBANEZ, O M. & STAROBINAS, N. (2002) Local inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* venom differs in mice selected for acute inflammatory response. *Toxicon* **40**:1571-79.
- CHEN, Y. L. & TSAI, I. H. (1995) Functional and sequence characterization of agkicetin, a new glycoprotein Ib antagonist isolated from *Agkistrodon acutus* venom.. *Biochem Biophys Res Commun.* **210**:472-7.
- CHUNG, C. H; AU L. C & HUANG, T. F. (1999) Molecular cloning and sequence analysis of aggrexin, a collagen-like platelet aggregation inducer. *Biochem Biophys Res Commun.* **263**:723-7.
- CORREA Jr, M. C; MARIA, D. A; MOURA-DA-SILVA, A M; PIZZOCARO, K. F & RUIZ, I. R. (2002) Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. *Toxicon.* **40**:739-48.
- CURTI, B.; MASSEY, V. & ZMADKA, M. (1968) Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. *The Journal of Biological Chemistry* **243**:2306-2314.

- CURTI, B.; RONCHI, S. & SIMONETTA, M. P. (1992) D- and L-amino acid oxidase. *In*: MULLER, F. (Ed.) *Chemistry and Biochemistry of Flavoenzymes* CRC Press., London, p.69-94.
- DA SILVA, R. J; DA SILVA, M. G; VILELA, L. C & FECCHIO, D (2002) Antitumor effect of *Bothrops jararaca* venom *Mediators Inflamm.* **11**:99-104.
- DA SILVA, C. J; JORGE, M. T & RIBEIRO, L. A. (2003) Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon.***41**:251-5
- DU, X. Y & CLEMETSON, K. J. (2002) Snake venom L-amino acid oxidases *Toxicon.* 40:659-65.
- EDMAN, P. (1950) Method for determination of the amino acid sequence in peptides. *Acta Chem. Scand.*, **4**, 283-293
- EHARA, T; KITAJIMA, S; KANZAWA, N; TAMIYA, T & TSUCHIYA, T. (2002) Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. *FEBS Letters* **531**:509-512.
- ESCALANTE, T; NUNEZ, J; MOURA DA SILVA, A M; RUCAVADO, A; THEAKSTON, R. D & GUTIERREZ J. M. (2003) Pulmonary hemorrhage induced by jararhagin, a metalloproteinase from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicol Appl Pharmacol.* **193**:17-28.
- FERNANDEZ-GOMEZ, R; ZERROUK, H; SEBTI, F; LOYENS, M & BENSLIMANE, A. (1994) Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. *Toxicon* **32**:875-882.
- FILHO-ZAGANELLI, G. L. (1996) Purificação e caracterização de enzimas coagulantes do fibrinogênio, das peçonhas de *Bothrops jararacussu*, *Bothrops neuwiedii*, e *Bothrops neuwiedii urutu*. *Tese de Doutorado.* 183p.

- FRANÇA, F. O. S & SANT`ANA-MÁLAQUE, C. M. (2003). Acidente botrópico. *In*: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD Jr., V. (Eds.) *Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. FAPESP, Ed. Sarvier, São Paulo, p. 72-86, 468p.
- FRANCIS, B; JORGE DA SILVA Jr, N; CASAIS e SILVA, L. L; SEEBART, C. & KAISER, I. I. (1997) Toxins isolated from the venom of the Brazilian coral snake (*Micrurus frontalis frontalis*) include hemorrhagic type phospholipases A₂ and postsynaptic neurotoxins. *Toxicon* **35**, 1193-1203.
- FRANCO, L. F. (2003) Origem e diversidade das serpentes. *In*: CARDOSO, J.L.C; FRANÇA, F.O.S; WEN, F.H; MÁLAQUE, C.M.S. & HADDAD Jr., V. (Eds.) *Animais peçonhentos do Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes*. FAPESP, Ed. Sarvier, São Paulo, p. 13-32, 468p.
- FUJIMURA, Y; TITANI, K; USAMI, Y; SUZUKI, M; OYAMA, R; MATSUI, T; FUKUI, H; SUGIMOTO, M. & RUGGERI, Z. M. (1991) Isolation and chemical characterization of two structurally and functionally distinct forms of botrocetin, the platelet coagglutinin isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry*. **30**:1957-64.
- GONÇALVES, A; SOARES, M. J; SOUSA, W; DAMATTA, R. A. & ALVES, E. W. (2002) Ultrastructural alterations and grow inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. *Parasitol Res* **88**:598-602.
- GREENE, H. W. (1977) *Snakes. The evolution of mystery in nature*. Berkeley: University of California Press, 351p.
- GUILLAUME, C; DEREGNAUCOURT, C; CLAVEY, V. & SCHREVEL, J. (2004) Anti-*Plasmodium* properties of group IA, IB, IIA and III secreted phospholipases A₂ are serum-dependent. *Toxicon* **43**:311-318.

- GUTIÉRREZ, J. M; AVILA, C; ROJAS, E & CERDAS,L. (1988) An alternative *in vitro* method for testing the potency of the polyvalent antivenom produced in Costa Rica. *Toxicon* **26**:411-413.
- GUTIÉRREZ, J. M & LOMONTE, B. (1989) Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. *Mem. Inst. Butantan* **51**:211-223.
- HAMAKO, J; MATSUI, T; SUZUKI, M; ITO, M; MAKITA, K; FUJIMURA, Y; OZEKI, Y & TITANI, K. (1996) Purification and characterization of bitiscetin, a novel von Willebrand factor nodulator protein from *Bitis arietans* snake venom. *Biochem. Biophys. Res. Commum.* **226**:273-279.
- HAYES, M. B & WELLNER, D. (1969) Microheterogeneity of L-amino acid oxidase. *The Journal of Biological Chemistry* **244**:6636-6644.
- HUANG, T. F; LIU, C. Z & YANG, S. H. (1995) Aggretin, a novel platelet-aggregation inducer from snake (*Calloselasma rhodostoma*) venom, activates phospholipase C by acting as a glycoprotein Ia/IIa agonist. *Biochem J. Aug* **309**:1021-7.
- IANZER, D; KONNO, K; MARQUES-PORTO, R; VIEIRA PORTARO, F. C; STOCKLIN, R; MARTINS DE CAMARGO, A C & PIMENTA, D. C. (2004). Identification of five new bradykinin potentiating peptides (BPPs) from *Bothrops jararaca* crude venom by using electrospray ionization tandem mass spectrometry after a two-step liquid chromatography *Peptides*. **25**:1085-92.
- JIMBO, M; NAKANISHI, F; SAKAI, R; MURAMOTO, K. & KAMIYA, H. (2003) Carcterization of L-amino acid oxidase and antimicrobial activity of aplyasinin A, a sea hare-derived antitumor-antimicrobial protein. *Fisheries Science* **69**: 1240-1246.
- JOHNSON, E. K; KARDONG, K. V. & OWNBY, C. L. (1987) Observations on white and yellow venoms from an individual southern pacific rattlesnake (*Crotalus viridis helleri*). *Toxicon* **25**:1169-1180.

- KOWALSKA M. A; TAN, L; HOLT, J. C; PENG, M; KARCZEWSKI, J; CALVETE, J. J. & NIEWIAROWSKI, S. (1998) Alboaggregins A and B. Structure and interaction with human platelets. *Thromb Haemost.* 79:609-13.
- LAEMMILI, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- LU, Q. M; JIN, Y; WEI, J. F; LI, D. S; ZHU, S. W; WANG, W. Y. & XIONG, Y. L. (2002) Characterization and cloning of a novel phospholipase A(2) from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake *Toxicon* **40**:1313-9.
- MACHEROUX, P; SETH, O; BOLLSCHWEILER, C; SCHWARZ, M; KURFURST, M; AU, L. C & GHISLA, S. (2001) L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*.: Comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme. *Eur J Biochem.* 268:1679-86.
- MARIA, W. S; CAMBUY, M. O; DAVID, J. C & CHAVEZ-OLÓRTEGUI, C. (1998) Neutralizing potency of horse antithrombotic antivenom. Correlation between *in vivo* and *in vitro* methods. *Toxicon* **36**:1433-1439
- MARUYAMA, M; SUGIKI, M; ANAI, K. & YOSHIDA, E. (2002) N-terminal amino acid sequences and some characteristics of fibrinolytic/hemorrhagic metalloproteinases purified from *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon.* **40**:1223-226
- MASSUDA, S; ARAKI, S; YAMAMOTO, T; KAJI, K. & HAYASHI, H. (1997) Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. *Biochemical and Biophysical Research Communications* **235**: 59-63.
- MATISUI, T; HAMAKO, J; SUZUKI, M; HAYASHI, N; ITO, M; MAKITA, K; FUJIMURA, Y; OZEKI, Y & TITANI, K. (1997) Complete amino acid sequence of bitiscetin, a novel von Willebrand factor modulator protein purified from snake venom of *Bitis arietans*. *Biochem. Cell Biol.* **1**:271-284.

- MEIER, J. (1986) Individual and age-dependent variations in the venom of the fer-de-lance (*Bothrops atrox*). *Toxicon* **24**:41-46.
- MINTON, S. A. (1970). *Snake venoms and Envenomation*. Marcel Dekker, INC., New York. 187p.
- NAGABABU, E; CHREST, F. J. & RIFKIND, J. M. (2003) Hydrogen-peroxide-induced heme degradation in red blood cells: the protective roles of catalase and glutathione peroxidase. *Biochimica et Biophysica Acta* **1620**:211-217.
- NAGABABU, E; CHREST, F. J. & RIFKIND, M, J.(2000) The origin of red cell fluorescence caused by hydrogen peroxide treatment. *Free Radical Biology & Medicine* **29**:659-663.
- NAGABABU, E. & RIFKIND, M, J. (1998) Formation of fluorescent heme degradation products during the oxidation of hemoglobin by hydrogen peroxide. *Biochem Biophys Res Commun.* **247**:592-596.
- NATIONAL COMMITTEE FOR CLINICAL LABORATORY STANDARDS. (2001) Methods for dilution antimicrobial susceptibility tests for bacteria that grow aerobically. Fifth Edition, v. 20, n. 2. *Approved Standard M 7. A5*, NCCLS, Wayne, Pa.
- NISHIDA, S; FUJIMURA, Y; MIURA, S; OZAKI, Y; USAMI, Y; SUZUKI, M; TITANI, K; YOSHIDA, E; SUGIMOTO, M. & YOSHIOKA, A. (1994) Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. *Biochemistry.* **33**:1843-9.
- OGAWA, T; CHIJIWA, T; ODA-UEDA, N. & OHNO, M. (2005) Molecular diversity and accelerated evolution of C-type lectin-like proteins from snake venom. *Toxicon.* **45**:1-14.
- PAINE, M. J. L; DESMOND, H. P; THEAKSTON, R. D. G. & CRAMPTON, J. M. (1992) Purification of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. *J. Biol. Chem.* **267**:22869-876.

- PÁRAMO, L; LOMONTE, B; PIZARRO-CERDÁ, J; BENGOCHEA, J. A; GORVEL, J. P. & MORENO, E. (1998) Bactericidal activity of Lys49 and Aps49 myotoxic phospholipases A2 from *Bothrops asper* snake venom: Synthetic Lys49 myotoxin II-(115-129)-peptide identifies its bactericidal region. *Eur. J. Biochem.* **253**:452-461.
- PAWELEK, D. P; CHEAH, J; COULOMBE, R; MACHEROUX, P; GHISLA, S & VRIELINK, A. (2000) The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *The EMBO Journal.* **19**:4204-4215.
- PESSATTI, M. L. FONTANA, J. D; FURTADO, M. F. D; GUIMARÃES, M. F; ZANETTE, L. R. S; COSTA, W. T. & BARON, M. (1995) Screening of *Bothrops* snake venoms for L-amino acid oxidase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology* **51**:197-210.
- PONNUDURAI, G; CHUNG, M. C. & TAN, N. H. (1994) Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch Biochem Biophys.* **313**:373-8.
- POUGH, F. H; HEISER, J. B. & MCFARLAND, W. N. (1999). *A vida dos vertebrados*. 2ª ed., Ed. Atheneu, São Paulo, 798p.
- SAKURAI, Y; TAKATSUKA, H; YOSHIOKA, A; MATSUI, T; SUZUKI, M; TITANI, K. & FUJIMURA, Y. (2001) Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. *Toxicon.* **39**:1827-33.
- SANCHEZ, E. F; FREITAS, T. V; FERREIRA-ALVES, D. L; VELARDES, D. T; DINIZ, M. R; CORDEIRO, M. N; AGOSTINI-COTTA, G. & DINIZ, C. R. (1992) Biological activities of venoms from South American snake. *Toxicon* **30**:95-103.
- SANCHEZ, E. O. F. & MAGALHÃES, A. (1991) Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta* venom. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* **24**:249-260.

- SANTAMARÍA, C; LARIOS, S; ANGULO Y; PIZARRO-CERDA J; GORVEL, J; MORENO, E. & LOMONTE, B. (2004) Antimicrobial activity of myotoxic phospholipases A₂ from crotalid snake venoms and synthetic peptide variants derived from their C-terminal region. *Toxicon* (*in press*).
- SANTOS, D.M. (2004). Caracterização do veneno de *Lycosa erythrognatha* e purificação de uma fração com atividade antibacteriana e inseticida. *Dissertação de Mestrado*. Universidade Federal de Minas Gerais. Belo Horizonte, MG, 105p.
- SCHENBERG, S. (1963) Immunological (ouchterlony method) identification of intraspecies qualitative differences in snake venom composition. *Toxicon* **1**:67-75.
- SEIGEL, R. A. & COLLINS, J. T. (1993) *Snakes: ecology & Behavior*. Ed. McGraw-Hill, 414p.
- SERRANO, S. M; REICHL, A. P; MENTELE, R; AUERSWALD, E. A; SANTORO M. L; SAMPAIO, C. A; CAMARGO, A. C. & ASSAKURA, M. T. (1999) A novel phospholipase A₂, BJ-PLA₂, from the venom of the snake *Bothrops jararaca*: purification, primary structure analysis, and its characterization as a platelet-aggregation-inhibiting factor. *Arch Biochem Biophys.*; **367**:26-32.
- SILVA, C. J; JORGE, M. T. & RIBEIRO, L. A. (2003) Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. *Toxicon* **41**:251-255.
- SOARES, A. M; ANDRILAO-ESCARSO, S. H; BORTOLETO, R. K; RODRIGUES-SIMIONI, L; ARNI R. K; WARD, R. J; GUTIERREZ, J. M. & GIGLIO, J. R. (2001) Dissociation of enzymatic and pharmacological properties of piratoxins-I and -III, two myotoxic phospholipases A₂ from *Bothrops pirajai* snake venom. *Arch Biochem Biophys.* **387**:188-96.
- SORG, O. (2004) Oxidative stress: a theoretical model or a biological reality? *C R Biol.* **327**:649-62.

- SOSA, B. P; ALAGON, A. C; POSSANI, L. D. & JULIA, J. Z. (1979) Comparasion of phospholipase activity with direct and indirect lytic effects of animal venoms upon human red cells. *Comp. Biochem. Physiol.* **64**:231-234.
- SOUZA, D. H. F; EUGENIO, L. M; FLETCHER, J. E; JIANG, M. S; GARRATT, R. C; OLIVA, G. & SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. (1999) Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. *Archives os Biochemistry and Biophysies* **368**:285-290.
- STABELI R. G; MARCUSSI, S; CARLOS, G. B; PIETRO, R. C; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S; GIGLIO, J. R; OLIVEIRA, E. B. & SOARES, A. M. (2004) Platelet aggregation and antibacterial effects of an l-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. *Bioorg Med Chem* **12**(11):2881-6.
- STILES, B. G; SEXTON, F. W. & WEINSTEIN, S. A. (1991) Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. *Toxicon* **29**:1129-1141.
- SUHR, S. M. & KIM, D. S. (1996) Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Biochem Biophys Res Commun* **224**:134-9.
- SUN, L. K; YOSHII, Y; HYODO, A; TSURUSHIMA, H; SAITO, A; HARAKUNI, T; LI, Y. P; KARIYA, K; NOZAKI, M. & MORINE, N. (2003) Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. *Toxicol In Vitro.* **17**:169-77.
- TAKATSUKA, H; SAKURAI, Y; YOSHIOKA, A; KOKUBO, T; USAMI, Y; SUZUKI, M; MATSUI, T; TITANI, K; YAGI, H; MATSUMOTO, M. & FUJIMURA, Y. (2001) Molecular characterization of L-amino acid oxidase from *Agkistrodon halys blomhoffii* with special reference to platelet aggregation. *Biochim Biophys Acta* **1544**:267-77.

- TAN, N. H. & PONNUDURAI, G. (1991) A comparative study of the biological properties of some venoms of snakes of the genus *Bothrops* (American Lance-Headed Viper). *Comp. Biochem. Physiol.***100**:361-365.
- TANIZAKI, M.M; ZINGALI, R. B; KAWAZAKI, H; IMAJOH, S; YAMAZAKI, S. & SUZUKI, K. (1989) Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon.***27**:747-55.
- TEMPONE, A. G; ANDRADE, H. F; SPENCER, P. J. & LOURENÇO, C. O. (2001) *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. With hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. *Biochemical and Biophysical Research Communications.* **280**, 620-624.
- THEAKSTON, R. D. G. & REID, A. H. (1979) Enzyme-Linked Immunosorbent assay (ELISA) in assessing antivenom potency. *Toxicon* **17**:511-515.
- THEAKSTON, R.D; WARRELL D.A. & GRIFFITHS, E. (2003) Report of a WHO workshop on the standardization and control of antivenoms. *Toxicon.* 41:541-57.
- TORII, S; NAITO, M. & TSURUO, T. (1997) Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom. *The Journal of Biological Chemistry* **272**:9539-9542.
- USAMI, Y; FUJIMURA, Y; SUZUKI, M; OZEKI, Y; NISHIO, K; FUKUI, H. & TITANI, K. (1993) Primary structure of two-chain botrocetin, a von Willebrand factor modulator purified from the venom of *Bothrops jararaca*. *Proc Natl Acad Sci* **90**:928-32.
- VIEIRA D. F; WATANABE, L; SANT'ANA, C. D; MARCUSSI, S; SAMPAIO, S. V; SOARES, A. M. & ARNI, R. K. (2004) Purification and characterization of jararassin-I, A thrombin-like enzyme from *Bothrops jararaca* snake venom. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai).* **36**:798-802

- WATANABE, L; VIEIRA, D. F; BORTOLETO, R. K. & ARNI, R. K. (2002) Crystallization of bothrombin, a fibrinogen-converting serine protease isolated from the venom of *Bothrops jararaca*. *Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.* **58**:1036-8.
- WEI, J. F; WEI, Q; LU, Q. M; TAI, H; JIN, Y; WANG, W. Y. & XIONG, Y. L. (2002) Purification, characterization and biological activity of an L-amino acid oxidase from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. *Sheng Wu Hua Xue Yu Sheng Wu Wu Li Xue Bao (Shanghai)*.**35**:219-24.
- WORLD HEALTH ORGANIZATION. Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms. Geneva: World Health Organization, 1981.
- YAN, L. & ADAMS, M. E. (1998) Lycotoxins, antimicrobial peptides from venom of the wolf spider *Lycosa carolinensis*. *The Journal of Biological Chemistry* **273**:2059-2066.
- ZHANG, Y. J; WANG, J. H; LEE, W. H; WANG, Q; LIU, H; ZHENG, Y. T. & ZHANG, Y. (2003) Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. *Biochem Biophys Res Commun.* **309**:598-604.