

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido
oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta*
(Serpentes, Viperidae)**

Cristiane Bregge da Silva

*Versão corrigida da **Tese de Doutorado** apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP*.

Ribeirão Preto

2011

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido
oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta*
(Serpentes, Viperidae)**

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título
de Doutor em Toxicologia.

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientada: Cristiane Bregge da Silva

Orientadora: Profa Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Ribeirão Preto

2011

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA, DESDE QUE CITADA A FONTE.

Silva-Bregge, Cristiane

Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta* (Serpentes, Viperidae). Ribeirão Preto, 2011
145 p. : il. ; 30cm.

Tese de Doutorado, apresentada à Faculdade de Ciências
Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP – Área de concentração:
Toxicologia.

Orientador: Braga, Eliane Candiani Arantes Braga

1. L-aminoácido oxidase. 2. *Lachesis muta* 3. Viperidae

FOLHA DE APROVAÇÃO

Cristiane Bregge da Silva

Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta* (Serpentes, Viperidae).

Tese de Doutorado apresentada ao
Programa de Pós-Graduação em
Toxicologia para obtenção do Título de
Doutor em Toxicologia

Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani
Arantes Braga

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Prof. Dr. _____

Instituição: _____ Assinatura: _____

Dedico minha tese de doutorado às únicas pessoas no mundo
que realmente viram o trabalho realizado para que eu
chegasse aqui.

À meu Pai Josoel, minha mãe Sueli, minha irmã Vanessa meu irmão Matheus,

Meu querido marido Aarón...

Perdão pela ausência todo esse tempo

Agradecimentos

À Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga, por toda orientação, sugestões e afagos em horas de problemas.

Ao Dr. José Maria Gutiérrez, Dr. Bruno Lomonte, Dra Alexandra Rucavado, Dra. Cecília Diaz, Dra. Tereza Escalante, Dra. Laura Monturiol, e Dra. Yamileth Angulo por todo tempo agradável que me proporcionaram enquanto estive em Costa Rica no Instituto Clodomiro Picado.

Ao Dr. Paulo Le Ho, Dr. Inacio Junqueira, Dra. Maria Cristina Nonato, Dr. Sérgio de Albuquerque, Dr. Marcelo Diniz, Dr. Hamilton Cabral pelo apoio científico.

Aos companheiros do Laboratório de Toxinas Animais: Karla Bordon (obrigada de coração sua ajuda técnica e emocional foi fundamental para meu amadurecimento) Flavia Pine, Yara e Juliana. Também agradeço aos alunos Camila, Mateus Baldo, Felipe, Franciele, Priscila, Caroline e Fernanda Amorim por bons momentos juntos.

Aos alunos de iniciação científica: Tibério Perini, Ernesto Lopes, Priscila Shibao, Gisele Wiesel, Amanda Machado, Marcio Perino, e Vinícius Coelho não só pelos momentos de prazer e riso, mas também pelas coisas que me ensinaram

Aos colegas do LCP (Laboratório de Cristalografia de Proteínas), que me ensinaram o que é compartilhar com paciência um lugar de trabalho

Aos meus amigos de graduação Clície Araujo e Eduardo Marturano, que sempre me apoiaram e que desde que os conheço me provam que alguns amigos são para sempre, aqueles amigos que não importa a distância e nem o tempo sempre estarão perto do coração

Ao meu amigo Fernando Anjolette, que sem dúvida nenhuma fez com que meu tempo no Laboratório de Toxinas animais fosse o mais agradável possível. Não me esquecerei dos dias que você trabalhou comigo até a madrugada... Você é realmente (junto com a minha família) testemunha do quanto trabalhei nesta tese

À amiga Taisa Manginelli, que sempre consegue tirar um sorriso meu, até nas horas difíceis. Toda vez que eu precisei de você, você estava aí pra me ajudar. Você, Taísa, está no meu coração, minha fada *Madrinha*.

À Maria Aparecida Segato (Cidinha) não tenho como agradecer toda a ajuda que você me deu com a burocracia

Ao Sr. Antônio (guarda da FCFRP-USP) que sempre me deixava entrar para trabalhar nos domingos que eu esquecia minha carteirinha USP, e a Sra. Evanira (copeira da FCFRP-USP) por me dar água com bençãos

Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo apoio financeiro

Agradeço especialmente aos meus pais, por todo o carinho e apoio, aos meus irmãos e ao meu querido marido Aarón pelo carinho

A todas pessoas que por mas que não as citei aqui, me ajudaram de forma direta ou indireta para que esse trabalho ficasse o melhor possível

Eu acredito demais na sorte.
E tenho constatado que, quanto mais duro eu trabalho,
mais sorte eu tenho.
Thomas Jefferson

RESUMO

SILVA-BREGGE, C. **Caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido oxidase isolada de peçonha de *Lachesis muta* (Serpentes, Viperidae)**. 2011. 145 f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

As peçonhas de serpentes contêm uma mistura complexa de substâncias farmacologicamente ativas, como metaloproteases, fosfolipases A₂, serino-proteases, L-aminoácido oxidase (LAAO), além de outros importantes compostos sem ação enzimática. LAAOs são flavoproteínas que catalisam a desaminação oxidativa de L-aminoácidos e produzem o α -cetoácido correspondente, com a concomitante liberação de amônia e peróxido de hidrogênio. A peçonha de *Lachesis muta* (*L. muta*) contém L-aminoácido oxidase, a qual pode contribuir com o envenenamento. Portanto, o objetivo deste trabalho foi a purificação da L-aminoácido oxidase de peçonha de *Lachesis muta* (LmLAAO) e a sua caracterização bioquímica, estrutural e funcional. Para isso, foram desenvolvidos dois protocolos distintos de purificação, os quais forneceram LmLAAO com grande pureza. No primeiro protocolo, 20 mg de peçonha bruta de *L. muta* foram submetidos a uma gel filtração em Sephacryl S100®. Das dez frações obtidas, a primeira fração apresentou atividade LAAO e foi submetida a mais um passo cromatográfico em Mono Q®. A homogeneidade da fração com atividade LAAO após a troca iônica foi comprovada por presença de banda única com 60,2 kDa em SDS-PAGE. O segundo protocolo de purificação foi uma sequência de três passos cromatográficos, na qual 200 mg de peçonha bruta de *L. muta* foram submetidos a gel filtração em Sephacryl S200®, seguido por interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose® e Affi-gel Blue Gel®. Da mesma forma, a pureza da enzima obtida depois desses passos cromatográficos foi comprovada por presença de banda única com 64 kDa em SDS-PAGE. Em ambos os protocolos de purificação, a LmLAAO manteve sua atividade enzimática. A massa molar de LmLAAO foi determinada por espectrometria de massas (MALDI-TOF) e apresentou valor de 60,85 kDa. Além disso, foi determinado o valor do ponto isoelétrico da LmLAAO como 5,1. A LmLAAO mostrou preferência catalítica por aminoácidos hidrofóbicos (L-Metionina, L-Leucina e L-Fenilalanina) e apresentou perda de atividade catalítica quando submetida a altos valores de pH ou de temperatura. Os parâmetros cinéticos foram determinados e a constante de Michaelis-Menten para o substrato L-Leucina foi de 0,9737 mmol/L e a velocidade máxima de reação foi de 0,06345 μ mol de peróxido de hidrogênio/min. A sequência N-terminal dos 40 primeiros resíduos da LmLAAO purificada foi determinada por degradação de Edman e a sua estrutura primária completa foi deduzida da sequência do cDNA obtido da glândula de

peçonha. Verificou-se uma grande identidade entre as sequências em aminoácidos da LAAO de *L. muta* e as de outros viperídeos. A estrutura da LmLAAO foi resolvida por substituição molecular usando as coordenadas atômicas da LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (PDB 1REO). As atividades farmacológicas da LmLAAO foram determinadas *in vivo* e *in vitro*. A injeção da enzima (10 µg) não induziu edema de pata em camundongos, nem hemorragia (50 µg) e nem toxicidade sistêmica (100 µg). No entanto, provocou uma leve mionecrose (100 µg) e edema em músculo quadríceps de camundongo, aumentando a creatina quinase plasmática. *In vitro*, foram testadas as atividades citotóxicas da LmLAAO em células de carcinoma. Os dados obtidos mostram IC₅₀ de 22,70 µg/mL, para linhagem AGS (carcinoma de estômago), e IC₅₀ de 1,41 µg/mL para a linhagem MCF-7 (carcinoma de mama). Para a atividade antiparasitária, foi determinada uma IC₅₀ de 2,22 µg/mL para a forma promastigota de *Leishmania brasiliensis*. No entanto, a LmLAAO (32 µg/mL) não apresentou toxicidade relevante para a forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi*. Concluindo, este trabalho descreve o isolamento e a caracterização estrutural e funcional de uma nova LAAO da peçonha de *L. muta*. A enzima mostrou efeitos antitumorais e leishmanicida, sem toxicidade sistêmica relevante, mas apresentou significativa ação edematogênica e miotóxica local. Este estudo é relevante não apenas por contribuir para uma melhor compreensão do papel da LAAO no envenenamento, mas também por demonstrar seu potencial biotecnológico como agente terapêutico.

Palavras-chave: L-aminoácido oxidase, atividade citotóxica, *Lachesis muta*, serpentes.

ABSTRACT

SILVA-BREGGE, C. **Purification, biochemistry and functional characterization of a new L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* venom.** 2011. 145p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2011.

Snake venoms comprise a complex mixture of pharmacologically active substances, such as metalloproteases, phospholipase A₂, serine proteases and L-amino acid oxidases (LAAOs) other compounds showing no enzymatic activity. LAAOs are flavoproteins catalyzing the oxidative deamination of L-amino acids to produce the corresponding α -keto acid with the concomitant release of ammonia and hydrogen peroxide. *Lachesis muta* (*L. muta*) venom contains L-amino acid oxidase which may contribute to the envenomation. The aim of this study is the purification of an L-amino acid oxidase from *Lachesis muta* venom (LmLAAO) and its structural and functional characterization. For that, two purification protocols were performed and both provided highly pure LmLAAO. In the first protocol, 20 mg of crude venom of *L. muta* were submitted to a gel filtration on Sephacryl S100® and yielded ten fractions, whose were tested for L-amino acid oxidase activity. The first fraction showed L-amino acid oxidase activity and it was submitted to a further chromatographic step on Mono Q®. The homogeneity of the fraction showing L-amino acid oxidase activity after ion exchange was confirmed by the presence of a single band corresponding to 60.2 kDa by SDS-PAGE. The second purification protocol was a sequence of three chromatographic steps, where 200 mg of crude *L. muta* venom were submitted to gel filtration on Sephacryl S200, followed by hydrophobic interaction on Phenyl Sepharose® and Affi-gel-Blue Gel. For the second protocol, the purity of LmLAAO was confirmed by the presence of a single band with 64 kDa as determined by SDS-PAGE. In both purification protocols LmLAAO kept its enzymatic activity. The molar mass of LmLAAO was determined by mass spectrometry (MALDI-TOF) and showed a value of 60.85 kDa. Moreover, the isoelectric point was 5.1. In addition, LmLAAO showed a catalytic preference for hydrophobic amino acids (L-methionine, L-leucine and L-phenylalanine) and lost its catalytic activity when subjected to high pH or temperature. The kinetic parameters for LAAO were determined and the Michaelis-Menten constant for the substrate L-leucine was 0.9737 mmol/L, and the maximum reaction velocity was 0.06345 μ mol hydrogen peroxide/min. Furthermore, the sequence of the first forty residues was determined by Edman degradation and the complete sequence of LmLAAO was resolved by cloning cDNA obtained from the venom glands. The amino acid

sequence of LmLAAO showed a great identity with sequences of LAAOs from other viper snakes. The LmLAAO structure was solved by molecular replacement using the atomic coordinates of the LAAO from *Agkistrodon halys pallas* (PDB 1REO). In addition, LmLAAO pharmacological activities were determined *in vivo* and *in vitro*. Thus, LmLAAO (10 µg) did not induce paw edema in mice, neither hemorrhage (50 µg) nor systemic toxicity (100 µg). However, it caused a mild myonecrosis (100 µg) and edema in the quadriceps muscles of mice, increasing plasma creatine kinase. *In vitro* activities of LmLAAO in carcinoma cells was assayed. The IC₅₀ of LmLAAO on AGS cell line (stomach cancer) was 22.70 µg / mL, and the IC₅₀ of LmLAAO on MCF-7 cell line (breast carcinoma) was 1.41 µg/mL. Moreover, antiparasitic activity of LmLAAO was determined on promastigote of *Leishmania brasiliensis* and an IC₅₀ of 2.22 µg/mL was found, whereas on trypomastigote form *Trypanosoma cruzi* LmLAAO showed no toxicity at doses of 32 µg/mL. In conclusion, this work reports the isolation and the structural and functional characterization of a new LAAO from *L. muta* snake venom. The enzyme showed antitumoral and leishmanicidal effects, without relevant systemic toxicity, but presented a significant local edema inducing and myotoxic action. This study is relevant not only for contributing to a better understanding of LAAO role in envenomation, but also for demonstrating its biotechnological potential as atherapeutic agent.

Keywords: L-amino acid oxidase, cytotoxic activity, *Lachesis muta*, snakes.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1.	Glândula de peçonha de viperídeos	4
Figura 2.	Cauda de uma serpente do gênero <i>Bothrops</i>	6
Figura 3.	Cauda de uma serpente do Gênero <i>Crotalus</i>	6
Figura 4.	<i>Lachesis muta stenophrys</i>	8
Figura 5.	<i>Lachesis muta melanocephala</i>	8
Figura 6.	Mapa de distribuição geográfica das espécies de <i>Lachesis</i> na América Central.....	9
Figura 7.	<i>Lachesis muta muta</i>	9
Figura 8.	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	10
Figura 9.	Mapa de distribuição geográfica das espécies de <i>Lachesis</i> na América do Sul.....	10
Figura 10.	Cauda de <i>Lachesis</i> sp.....	11
Figura 11.	Reação de desaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido catalisado por uma LAAO	17
Figura 12.	Estrutura de L-aminoácido oxidase de <i>Calloselasma rhodostoma</i> complexada com L-fenilalanina.....	19
Figura 13.	Sítio ativo em formato de Y da L-aminoácido oxidase da <i>Caloselasma rhodostoma</i>	19
Figura 14.	Sítio catalítico de LAAO de <i>Calloselasma rhodostoma</i> complexado com citrato	20
Figura 15.	Modelo estrutural dimérico de LAAO de <i>Caloselasma rhodostoma</i> com os sítios de N-Glicosilação	21
Figura 16.	Estrutura parcial da resina Sephacryl®	30
Figura 17.	Método empregado na purificação de LmLAAO em Mono Q® por meio de Gradiente segmentado.. ..	31
Figura 18.	Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Shodex® por meio de gradiente segmentado.....	32
Figura 19.	Método empregado na purificação de LmLAAO em Phenyl Sepharose® por meio de gradiente segmentado.....	33

Figura 20. Estrutura da resina usada na cromatografia de interação hidrofóbica	34
Figura 21. Método empregado na purificação de LmLAAO em Affi-Gel Blue® por meio de gradiente segmentado.....	35
Figura 22. Estrutura química do corante da resina Affi-Gel Blue®.	35
Figura 23. Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Analítica Vydac® por meio de gradiente segmentado	36
Figura 24. Formação do cátion cromóforo por meio da oxidação de <i>o</i> -fenilenodiamino ...	37
Figura 25. Sequenciamento de aminoácidos por Degradação de Edman	42
Figura 26. Perfil cromatográfico de eluição da peçonha bruta de <i>Lachesis muta</i> em Sephacryl S100®.	51
Figura 27. SDS-PAGE (10%) da Fração SLm1	52
Figura 28. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em Sephacryl S100 ®	53
Figura 29. Perfil de eluição em Mono Q® da fração SLm1 com atividade L-aminoácido oxidase proveniente Sephacryl S100® em resina Mono Q®	54
Figura 30. SDS-PAGE (10%) da Fração MQLm2.....	55
Figura 31. Curva de calibração para determinação da massa molecular de proteínas purificadas em Mono Q®	56
Figura 32. Perfil de eluição da fração MQLm2 em coluna de fase reversa C4 Shodex®.	57
Figura 33. SDS-PAGE (10%) da Fração C1 eluída de C4 Shodex®.....	58
Figura 34. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas em C4 Shodex®.	58
Figura 35. Perfil cromatográfico de eluição da peçonha bruta de <i>Lachesis muta</i> em Sephacryl S200®.	59
Figura 36. SDS-PAGE (10%) da Fração SpLm1 eluída de Sephacryl S200®.....	60
Figura 37. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em Sephacryl S200 ®.	61
Figura 38. Perfil cromatográfico de eluição da fração SpLm1 proveniente de Sephacryl S200® em Phenyl-Sepharose®.	61

Figura 39. SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da Fração FSLm1 eluída de Phenyl-Sepharose®	62
Figura 40. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em Phenyl-Sepharose®	63
Figura 41. Perfil cromatográfico de eluição da fração FSLm1 proveniente de Phenyl Sepharose ® em Affi-Gel Blue®	64
Figura 42. SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da Fração AfLm1 eluída de Affi-Gel Blue®	65
Figura 43. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em Affi-Gel Blue®	65
Figura 44. Perfil cromatográfico de eluição da fração AfLm1 em coluna C4 analítica Vydac®	66
Figura 45. Preferência catalítica de LmLAAO frente diferentes aminoácidos	69
Figura 46. Curva de calibração da liberação de peróxido de hidrogênio	70
Figura 47. Dependência da variação de pH para atividade L-aminácido oxidase em ensaio colorimétrico determinado por <i>o</i> -fenilenodiamino em microplaca	71
Figura 48. Dependência da variação de pH para atividade L-aminácido oxidase quando LmLAAO é incubada por 30 minutos em tampões com diferentes pHs	71
Figura 49. Dependência da variação de temperatura para atividade L-aminácido oxidase	72
Figura 50. Velocidade catalítica de LmLAAO em função da concentração de substrato: cinética Michaelis-Menten	74
Figura 51. Cladograma mostrando as relações filogenéticas entre as estruturas primárias de LmLAAO e LAAOs de outras espécies de serpentes	77
Figura 52. Alinhamento múltiplo realizado pelo programa MultAlin entre LmLAAO e LAAO de outras serpentes	79
Figura 53. Alinhamento sequencial de LmLAAO (Lachesis) com LAAO de <i>Agkistrodon halys pallas</i> (Agkistrodon)	82
Figura 54. Estrutura tridimensional de LmLAAO	83
Figura 55. Cavidade do cofator FAD. Esta cavidade é formada entre o domínio de ligação do substrato e o domínio substrato de ligação do cofator FAD	84
Figura 56. Superfície LmLAAO	85

Figura 57. Modelo molecular de LmLAAO resolvida por substituição molecular usando as coordenadas atômicas da LAAO de <i>Agkistrodon halys pallas</i> (PDB 1REO).....	86
Figura 58. Espectro de massas da LmLAAO.....	88
Figura 59. Estrutura química do grupo dodecassacarideo ligado a LAAO de <i>Caloselasma rhodostoma</i>	88
Figura 60. Focalização isoeétrica da LmLAAO em gel de poliacrilamida a 5%.....	90
Figura 61. Edema em pata de rato depois da injeção de 10 µg de LmLAAO.....	92
Figura 62. Miotoxicidade in vivo causada pela LmLAAO após 3 horas da injeção intravenosa de LmLAAO.....	93
Figura 63. Creatina-quinase plasma de camundongos injetados LmLAAO.....	94
Figura 64. Morfologia do músculo cardíaco de camundongos depois de 3 horas da injeção intravenosa de LmLAAO.....	95
Figura 65. Morfologia do tecido pulmonar de camundongos depois de 3 horas da injeção intravenosa de LmLAAO.....	96
Figura 66. Morfologia dos túbulos renais de camundongos depois de 3 horas da injeção intravenosa de LmLAAO.....	97
Figura 67 Atividade citotóxida de LmLAAO sobre linhagem de carcinoma estomacal AGS.....	98
Figura 68 Atividade citotóxida de LmLAAO sobre linhagem de carcinoma estomacal MCF-7.....	99
Figura 69 Atividade citotóxida de LmLAAO sobre a forma promastigota de <i>Leishmania braziliensis</i>	100
Figura 70 Atividade citotóxida de LmLAAO sobre a forma tripomastigos da linhagem Brener de <i>Trypanosoma cruzi</i>	101

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Recuperação protéica e recuperação da atividade L-aminoácido oxidase de cada fração cromatografada no protocolo de purificação 1	67
Tabela 2	Recuperação proteica e recuperação da atividade L-aminoácido oxidase de cada fração cromatografada no protocolo de purificação 2	67
Tabela 3	Sequência amino-terminal dos 40 primeiros resíduos de LmLAAO.....	75
Tabela 4	Sequência deduzida da proteína LmLAAO pela sequência cDNA	75
Tabela 5	Sequons presentes em LmLAAO e seus potenciais para N-glicosilação.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACN	Acetonitrila
ADP	Adenosina Difosfato
ATP	Adenosina Trifosfato
AZT	Anilino-tiazolina
cDNA	Ácido Desoxirribonucleico complementar
CRISPs	<i>Cysteine-rich secretory proteins</i> - Proteínas Secretadas Ricas em Cisteínas
CK	Creatinaquinase
DL₅₀	Dose Letal 50 %
FAD	Flavina Adenina Dinucleotídeo
EST	Expressed Sequence Tags
HPLC	High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
HMWS	Padrão de Alta Massa Molar (High Molecular Mass Standard)
IC₅₀	Concentração Inibitória 50%
K_m	Constante de Michaelis-Menten
LAAO	L- aminoácido oxidase
LmLAAO	L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta rhombeta</i>
LmPB	Peçonha Bruta de <i>Lachesis muta</i>
LMWS	Padrão de Baixa Massa Molar
L-NAME	L-Nitro-Arginina Metil Ester

MALDI-TOF	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Fly
MES	Ácido 2-(N-morpholino) etano sulfônico
MTT	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
NADH	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
PBS	Phosphate Buffered Saline (Salina tamponada com fosfato)
pI	Ponto Isoelétrico
PITC	Fenilisotiocianato
PTH	Feniltiohidantoína
RPMI	Instituto Roswell Park Memorial
SDS – PAGE	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio
<i>t</i>	Distribuição de T-student
TFA	Ácido Trifluor Acético
Tris-HCl	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
U	Distribuição de Mann–Whitney
VC	Volume de Coluna
V_{max}	Velocidade Máxima

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DOS AMINOÁCIDOS

Ácido Aspártico	Asp	D
Ácido Glutâmico	Glu	E
Alanina	Ala	A
Arginina	Arg	R
Asparagina	Asn	N
Cisteína	Cys	C
Fenilalanina	Phe	F
Glicina	Gly	G
Glutamina	Gln	Q
Histidina	His	H
Isoleucina	Ile	I
Leucina	Leu	L
Lisina	Lys	K
Metionina	Met	M
Prolina	Pro	P
Serina	Ser	S
Tirosina	Tyr	Y
Treonina	Thr	T
Triptofano	Trp	W
Valina	Val	V

LISTA DE SÍMBOLOS

®	Registrado
TM	Trade Mark

SUMÁRIO

Resumo	i
Abstract	iii
Lista de Figuras	v
Lista de Tabelas	ix
Lista de Abreviaturas e Siglas	x
Lista de Abreviaturas e Siglas dos Aminoácidos	xii
Lista de Símbolos	xiii
1. Introdução	1
1.1. Ordem <i>Squamata</i> , Subordem Serpentes	2
1.1.1. Morfologia e comportamento geral das serpentes	3
1.1.2. Família <i>Viperidae</i> : Glândula de peçonha e dentes	3
1.1.3. Família <i>Viperidae</i> no Brasil: Os gêneros mais importantes	5
1.1.4. <i>Lachesis muta</i>	7
1.2. Patologia do envenenamento do gênero <i>Lachesis</i>	11
1.3. Potencial biotecnológico de venenos e peçonhas	13
1.4. Diferentes componentes das peçonhas de serpente	15
1.5. L-aminoácido oxidase (LAAO)	17
1.5.1. Massa Molar e ponto isoelétrico de diferentes LAAOs	17
1.5.2. Aspectos Estruturais de LAAOs	18
1.5.3. Sítios de Glicosilação	20
1.5.4. Propriedades da cinética enzimática de LAAO	21
1.5.5. Atividades farmacológicas de LAAOs	22
2. Objetivos	25
2.1. Objetivos Gerais	26
2.2. Objetivos Específicos	26
3. Material e Métodos	27
3.1. Reagentes e Equipamentos	28
3.2. Peçonha	29
3.3. Fracionamento da peçonha de <i>Lachesis muta</i> para obtenção de LmLAAO	29
3.3.1. Protocolo de purificação 1	29
3.3.2. Protocolo de purificação 2	32

3.4. Ensaio de atividade L-aminoácido-oxidase	36
3.4.1. Prospecção de L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta</i> em frações obtidas por cromatografia	37
3.5. Estudos de cinética enzimática	38
3.5.1. Determinação da especificidade de L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta</i> frente a diferentes aminoácidos.	38
3.5.2. Determinação do melhor pH do meio reacional de Atividade L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta</i> e influência do pH em sua atividade	38
3.5.3. Determinação da atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO depois de incubada em diferentes temperaturas.....	39
3.5.4. Determinação de K_m e V_{max} da LmLAAO	39
3.6. Determinação da massa molar da LAAO de <i>Lachesis muta</i>	40
3.6.1 Determinação do massa molar por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS.....	40
3.6.2. Determinação da massa molar por espectrometria de massa.....	40
3.7. Sequenciamento amino-terminal	41
3.8. Clonagem e sequenciamento de cDNA da LmLAAO.....	43
3.9. Análise <i>in silico</i>	43
3.10. Determinação do ponto isoeletrico	44
3.11. Atividades Farmacológicas.....	45
3.11.1. Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	45
3.11.2. Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	47
3.12. Análises Estatísticas	49
4. Resultados e Discussão	50
4.1. Fracionamento da peçonha de <i>Lachesis muta</i> para obtenção da LmLAAO.....	51
4.1.1. Protocolo de purificação 1	51
4.1.2. Protocolo de purificação 2.....	58
4.2. Ensaio de atividade L-aminoácido-oxidase	68
4.3. Estudos de cinética enzimática	68
4.3.1. Determinação da especificidade da LmLAAO frente a diferentes aminoácidos.....	68
4.3.2. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio	69
4.3.3. Determinação do melhor pH do meio reacional para a atividade da L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta</i> e influência do pH de incubação para sua atividade.....	70
4.3.4. Determinação da atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO depois de pré-incubada em diferentes temperaturas	72
4.3.5. Determinação de K_m e V_{max} da LmLAAO	73
4.4. Sequenciamento amino-terminal	75

4.5. Clonagem e sequenciamento de cDNA da LmLAAO.....	75
4.6. Análise <i>in Silico</i>	76
4.6.1. cDNA da LmLAAO	76
4.7. Determinação da massa molar por espectrometria de massa.....	87
4.8. Determinação do ponto isoelétrico (pI)	89
4.9. Atividades Farmacológicas.....	90
4.9.1. Atividades <i>in vivo</i>	90
4.9.2. Atividades <i>in vitro</i>	97
5. Conclusões	102
6. Referências	104
Anexos.....	122

1. Introdução

Desde a antiguidade, o ser humano usa produtos de origem animal ou vegetal para tratar seus males. A natureza era a fornecedora de matéria prima para os remédios preparados na forma de infusões, extratos fluidos ou emplastos. Com o passar dos tempos, só o conhecimento de quais preparações curavam não era mais suficiente. Era necessário saber o mecanismo pelo qual o medicamento curava. E foi dessa ânsia de saber mais, que muitas vidas foram salvas.

Neste contexto, não se destaca apenas o trabalho dos antigos boticários ou químicos farmacêuticos, mas também os estudos dos primeiros anatomistas e patologistas. Para curar alguém é necessário saber a maneira correta pela qual o organismo doente reage a um mal infringido, bem como conhecer a natureza do agente agressor. Os efeitos causados por envenenamentos, tanto por substâncias de origem vegetal como de origem animal, estimularam os estudos de plantas e animais peçonhentos sendo necessário, portanto, o conhecimento de qual gênero ou espécie é proveniente a substância tóxica.

A classificação taxonômica correta de plantas e animais peçonhentos é de grande importância para os pesquisadores de toxinologia. Tal estudo permite identificar a espécie correta do animal, o que é fundamental para gerar dados reprodutíveis em pesquisa, para a produção de antivenenos e para a melhoria do tratamento em casos de acidentes. No entanto, infelizmente a taxonomia de alguns grupos não é realizada de forma adequada, pois além da frequente descoberta de animais não catalogados, algumas espécies já classificadas são comumente renomeadas (QUIJADA-MASCARENHAS, WUSTER, 2010). Tal fato observa-se na subordem das serpentes, a qual sofre constantes modificações, necessitando da ajuda de herpetologistas para confirmação da origem das peçonhas utilizadas nos estudos.

1.1. Ordem *Squamata*, Subordem Serpentes

Animais vertebrados, as serpentes são representantes da classe *Reptilia* com grande sucesso de irradiação¹, tanto em termos de número de espécies quanto de distribuição geográfica (CADLE, 1987; KEOGH, 1998). Pode-se, pela observação da distribuição atual das serpentes, estimar quando evoluíram e como foi sua propagação. As serpentes da Europa têm muitos aspectos em comum com as da América do Norte e as serpentes da América do Sul possuem uma maior semelhança com espécies da África. Essa dispersão ocorreu

¹ Irradiação adaptativa é caracterizada pela evolução de um grupo de espécies as quais têm um ancestral comum (RIBEIRO et al., 2008).

provavelmente quando o antigo continente do Sul, Gondwana, foi separado do continente Norte, Laurásia (IBAMA, 2008).

No Brasil os gêneros de serpentes com importância em saúde pública são oito: *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Caudisona*, *Lachesis*, *Rhinocerophis* (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2011) e *Micrurus* (coral verdadeira) (BRASIL-MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Dos oito gêneros citados, os sete primeiros pertencem à família Viperidae. Observa-se dessa forma, a importância do conhecimento dos aspectos patológicos do envenenamento por viperídeos e a caracterização dos componentes da peçonha desta família.

1.1.1. Morfologia e comportamento geral das serpentes

As serpentes são caracterizadas pelo corpo alongado e ausência de patas, além de possuírem escamas como anexos epidérmicos, as quais lhe podem dar um aspecto opaco ou brilhante (JIM e SAKATE¹, 1978 apud DOWLING e DUELLMAN, 1994). São carnívoras obrigatórias e a relativa desvantagem de não possuírem patas foi minimizada pelo desenvolvimento da alimentação inercial e pela cinose craniana. A introdução do alimento é feita pela retirada dos dentes antes enfiados na presa e concomitante movimento lateral da cabeça. A cinose craniana permite a deglutição de alimentos relativamente grandes, devido à mobilidade dos ossos do crânio da serpente. Existem dois comportamentos mais comuns para caça, sendo o primeiro tipo a emboscada, no qual a presa não está fugindo, e o segundo tipo é o forrageador, no qual a serpente revolve o esconderijo da presa (JIM e SAKATE, 1994). O acasalamento e reprodução são variáveis nas serpentes, mas normalmente envolvem alterações climáticas, as quais desencadeiam variações hormonais nos animais (SOUZA, 2007).

1.1.2. Família Viperidae: Glândula de peçonha e dentes

Na Ordem *Squamata* a presença de glândulas especializadas para liberação de peçonha é observada somente nas serpentes e alguns lagartos da Família *Helodermatidae*, sendo que nestes últimos a glândula é posicionada na região mandibular e nas serpentes na região maxilar (FRY et al., 2006).

¹ JIM, J.; SAKATE, M. Biologia das Serpentes. In: ___ **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas. Cap 9, 1994, p.109-134.

Elapídeos e Viperídeos possuem um músculo contrator de glândula que ajuda a peçonha seguir para o ducto condutor da presa (dentes). A presença deste músculo pode ser considerada como uma sinapomorfia¹ entre as serpentes peçonhentas, pois ao longo da evolução está presente em diferentes espécies. Alguns estudos demonstram que o músculo contrator pode ter sua origem em diferentes músculos adutores presentes na região temporal do crânio da serpente (JACKSON, 2003).

As glândulas das subfamílias Viperinae e Crotalinae são geralmente muito similares (BDOLAH, 1979). O aparelho glandular dos viperídeos possui quatro regiões diferentes denominadas glândula principal, ducto primário, glândulas acessórias e o ducto secundário, o qual se liga à presa. A Figura 1 mostra a glândula principal, a qual é formada por tubos constituídos de células secretoras, interligados entre si e desembocando em um lúmen principal (BDOLAH, 1979). Dessa forma, a peçonha é encaminhada até os dentes e a inoculação é feita na hora do ataque.

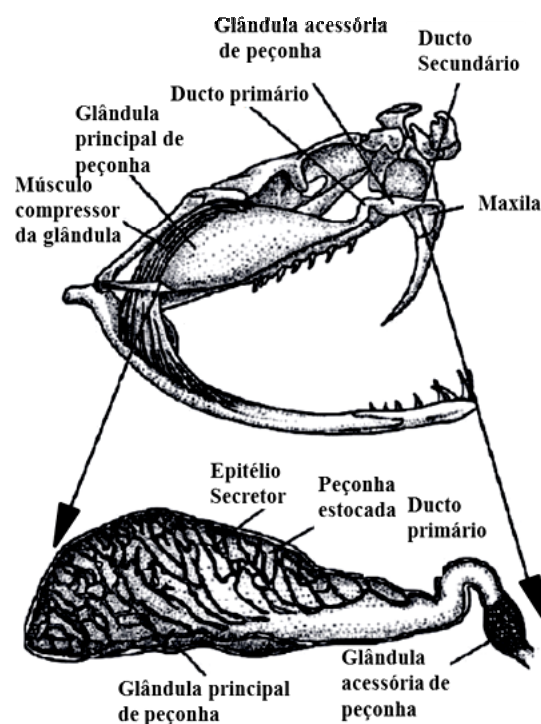


Figura1. Glândula de peçonha de viperídeos. A peçonha é produzida pelo epitélio secretor e armazenada até a hora da mordida. No momento do ataque, o músculo compressor pressiona a glândula e a peçonha liberada é injetada na presa. Adaptado de Weisten² et al., 2002 apud Kardong, 2010, p.71.

¹ Sinapomorfia é o termo usado para designar características mais recentes derivadas de características mais antigas e que agrupam os seres em uma única categoria (GUIMARÃES, 2011).

² WEISTEN, S.A.; SMITH, T.L. KARDONG, V. R. Reptile venom glands: form, function and future. In: ____ **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, cap.3 p 65-95.

Os estudos realizados nas glândulas de viperídeos não se restringem a análise da anatomia e fisiologia das mesmas. Atualmente, o uso de glândulas de peçonhas para extração de RNA e concomitante produção de bibliotecas de cDNA é uma das estratégias usadas para análise da estrutura e expressão de genes eucarióticos. Fry et al. (2006) usaram glândulas de representantes de serpentes, iguanas e anguimorfos para a construção de bibliotecas de cDNA e os transcritos mostraram um padrão semelhante de toxinas, como CRISPs (*Cysteine-rich secretory proteins*), peptídeos natriuréticos tipo B e crotamina. A presença destas toxinas pode ter sido um fator chave na radiação adaptativa e no sucesso desses répteis.

Com respeito à dentição, os viperídeos estão localizados na série solenóglifa. A série solenóglifa é caracterizada pela presença de animais com dentes muito desenvolvidos, os quais têm um canal interno que se comunica com o canal excretor da glândula de peçonha (JIM e SAKATE, 1994). A distinção entre as serpentes peçonhentas das não peçonhentas pode ser feita também por observação da presença de um orifício entre o olho e a narina da serpente, denominado fosseta loreal. Esta estrutura, extremamente rica em terminações nervosas, permite à serpente perceber a presença de calor e, assim, caçar no escuro presas homeotérmicas, tais como mamíferos e aves. Além da fosseta loreal, a dentição das serpentes pode diferenciá-las entre peçonhentas e não peçonhentas. As primeiras apresentam dentes dianteiros longos, completamente canaliculados, lembrando uma agulha de injeção. São curvados para trás quando a serpente está com a boca fechada e se movem para frente no momento em que é desferido o bote. (BUTANTAN, 2008).

1.1.3. Família *Viperidae* no Brasil: Os gêneros mais importantes

Segundo Bérnils (2010), o Brasil possui 371 espécies de serpentes. A família Viperidae possui sete gêneros representados por *Bothriopsis*, *Bothrocophias*, *Bothropoides*, *Bothrops*, *Caudisona*, *Lachesis* e *Rhinocerophis* (SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA, 2011).

Gêneros Bothrops e Bothropoides

Morfologicamente, as serpentes do gênero *Bothrops* (ex. *B. atrox*) e do gênero *Bothropoides* (*B. jararaca*) podem ser diferenciadas das outras por apresentar um perfil de cauda afilada (Figura 2). Habitam ambientes úmidos, possuem hábitos noturnos e são consideradas as mais agressivas, tendo um comportamento de ataque em silêncio. O acidente

botrópico é caracterizado por ação coagulante, necrosante além de vasculotóxica. (BARRAVIERA e PEREIRA, 1994).



Figura 2. Cauda de uma serpente do gênero *Bothrops*. Em detalhe, o aspecto afilado da cauda. Foto de Aarón Gómez (2011).

Gênero Crotalus

As serpentes do gênero *Crotalus* possuem como característica marcante a presença do chocalho na porção terminal da cauda (Figura 3). São comumente encontradas em áreas secas e pedregosas, como o cerrado brasileiro (CAMPBELL; LAMAR, 1989). Elas são serpentes vivíparas e reproduzem-se normalmente entre dezembro e fevereiro (MELGAREJO, 2003). O acidente crotálico, embora menos comum que o botrópico, é muito grave e apresenta efeitos graves em músculos, sangue e até sistema nervoso (BARRAVIERA, 1994).



Figura 3. Cauda de uma serpente do Gênero *Crotalus*. Em detalhe, o chocalho que caracteriza o gênero. Foto de Aarón Gómez (2011).

Gênero *Lachesis*

Os animais do gênero *Lachesis* têm sido motivo de estudos filogenéticos (ZAMUDIO e GREENE, 1997), epidemiológicos (FISZON e BOCHNER, 2008), patológicos (JORGE et al., 1997), bioquímicos e toxicológicos (SANZ et al., 2008). Dessa forma, é notória a importância desse gênero em diferentes aspectos da ciência.

1.1.4. *Lachesis muta*

Segundo Campbell e Lamar (1989), o gênero *Lachesis* inclui em sua única espécie *muta*, quatro subespécies: *Lachesis muta stenophrys* (Figura 4) distribuída na costa Atlântica da Nicarágua, além de Costa Rica, Panamá e na Colômbia na sua região do Oceano Pacífico; *Lachesis muta melanocephala*, (Figura 5) restrita à Costa Rica (ver distribuição geográfica dessas duas espécies na Figura 6), *Lachesis muta muta* (Figura 7) presente em florestas tropicais da Colômbia, Venezuela, Guianas, Suriname, Peru, Equador e Brasil e *Lachesis muta rhombeata* (Figura 8), presente na floresta Atlântica no Brasil (ver distribuição geográfica dessas duas últimas espécies na Figura 9). Porém, uma nova classificação foi sugerida por Zamudio e Greene (1997) baseada em estudos realizados em seqüência de DNA mitocondrial das escamas ventrais de diferentes serpentes do gênero *Lachesis*. Eles sugerem que as serpentes deste gênero devem ser classificadas em três diferentes espécies: *Lachesis stenophrys* (Figura 4) e *Lachesis melanocephala* (Figura 5) distribuídas na América Central e *Lachesis muta* (a qual englobaria as duas subespécies *Lachesis muta muta* (Figura 7) e *Lachesis muta rhombeata* (Figura 8)).

Zamudio e Greene (1997) sugerem que, embora os haplótipos¹ que representam *L.m.rhombeata* sejam distintos e formem o seu próprio clado, sua localização filogenética é incerta. A *L.m.muta* da região Amazônica pode estar mais próxima da *L.m.rhombeata* do que de outras populações de *L.m.muta*. Zamudio e Greene (1997) também sugerem que a *L.m.muta* e a *L.m.rhombeata* podem continuar sendo reconhecidas como subespécies por aqueles que consideram que isso possa ser útil em sistemática, mas que por seus experimentos a partir de cDNA mitocondrial, não veem razão para que essas populações sejam assim classificadas.

¹ Haplotipo é uma população segregada sob pressão da seleção natural. A diversidade haplotípica pode representar segregação populacional (FREITAS et al., 2009).



Figura 4. *Lachesis muta stenophrys*. Disponível em: <http://home.comcast.net>



Figura 5. *Lachesis muta melanocephala*. Foto de: Alejandro Solorzano

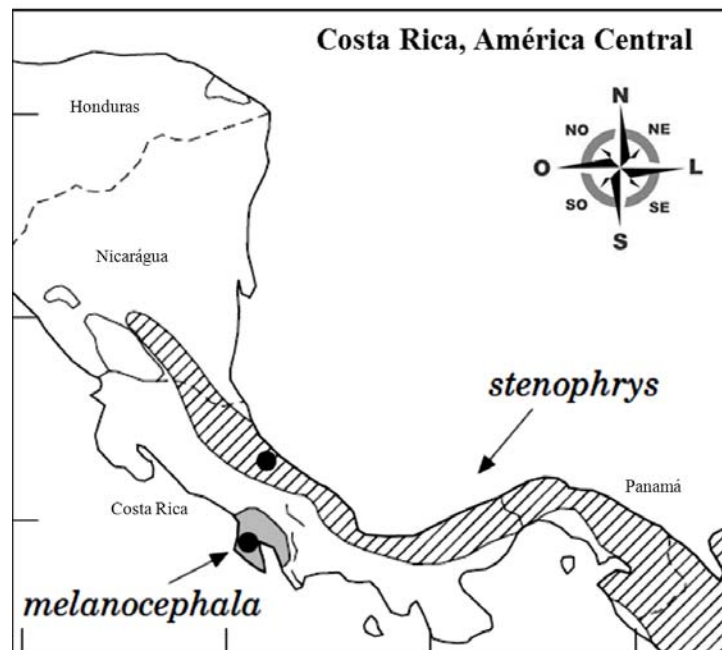


Figura 6. Mapa de distribuição geográfica das espécies de *Lachesis* na América Central. Adaptado de Zamudio e Greene, 1989 apud Campbell e Lamar, 1997, p.71.



Figura 7. *Lachesis muta muta*. Disponível em: <http://www.jcvi.org>



Figura 8. *Lachesis muta rhombeata*. Fonte: Laboratório de Toxinas Animais - FCFRP-USP

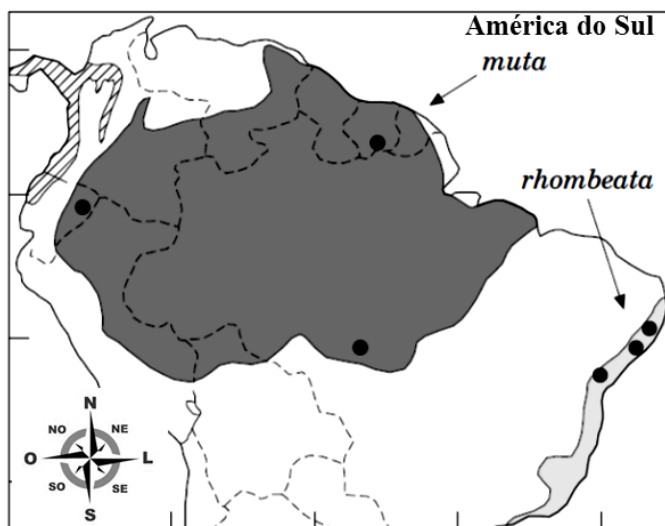


Figura 9. Mapa de distribuição geográfica das espécies de *Lachesis* na América do Sul. Adaptado de Zamudio e Greene, 1989 apud Campbel e Lamar, 1997, p.71.

No Brasil as serpentes do gênero *Lachesis* são popularmente conhecidas por **surucucu**, **surucucu-pico-de-jaca**, **surucutinga**, **malha-de-fogo** e são encontradas em áreas florestais como Amazônia, Mata Atlântica e em algumas áreas das matas úmidas do Nordeste (FUNASA, 2001).

Morfologicamente as *Lachesis* são serpentes grandes, sendo umas das maiores representantes da família Viperidae. Atingem em média 3,5 metros de comprimento e seu corpo apresenta desenhos típicos, que alternam entre as cores amarela e preta. Sua cauda tem as últimas subfileiras de escamas modificadas, apresentando-se quilhadas e eriçadas além de apresentar um espinho terminal (MELGAREJO, 2003) (Figura 10).



Figura 10. Cauda de *Lachesis*. Detalhe das últimas fileiras subcaudais quilhadas e eriçadas e o espinho terminal. Foto de Aarón Gómez (2011)

Normalmente essas serpentes apresentam hábitos noturnos e preferem o interior de florestas, o que pode explicar a menor incidência dos acidentes laquéticos com humanos, quando comparados com o gênero *Bothrops* (MÁLAQUE e FRANÇA, 2003). Trabalhos de criação de *Lachesis sp.* em cativeiro desenvolvidos por Souza (2007) mostram que essas serpentes não apresentam época diferenciada para acasalamento e, diferentemente de outras serpentes Viperiadae, o gênero *Lachesis* é ovípara. Os ovos de *Lachesis sp* são grandes (73 x 45 mm eixo maior e menor, respectivamente), elipsoidais e são postos cerca de 15 ovos por época de reprodução (MELGAREJO, 2003; SOUZA, 2007).

Em 1989, o Instituto Brasileiro do Meio Ambiente (IBAMA) lançou uma lista de animais em “extinção” e dentre estes, estava a *Lachesis muta rhombeata*. Hoje, a espécie é considerada “vulnerável” pela International Union for the Conservation of Nature (SOUZA, 2006). SOUZA (2007) em seu trabalho mostra a possibilidade de reversão deste quadro pelo sucesso da reprodução da serpente em cativeiro.

1.2. Patologia do envenenamento do gênero *Lachesis*

O envenenamento por serpentes do gênero *Lachesis* caracteriza-se por dor, formação de edema e bolhas, necrose, distúrbios da coagulação, além de vômitos, hipotensão arterial, tonturas, escurecimento da visão, bradicardia, cólicas abdominais e diarreia, sintomas característicos de síndrome vagal (JORGE et al., 1997). Embora o acidente laquético produza

efeitos semelhantes ao acidente botrópico, a síndrome vagal torna-se um importante diferencial no diagnóstico, pois está presente no acidente laquético. As complicações locais podem envolver síndrome compartimental a qual é decorrente da compressão do feixe vâsculo-nervoso devido ao grande edema que se desenvolve no membro atingido, produzindo assim, isquemia de extremidades, necrose e infecção secundária (FUNASA, 2001).

Outros estudos demonstram que a peçonha da *L. muta spp* promove efeitos neurotóxicos em preparações *in vitro* de nervo frênico (inervação de diafragma) de rato e miotóxicos em músculo biventer-cervicis de ave (DAMICO et al., 2005). A formação de coágulos sanguíneos promovidos pela ação da peçonha de *L. muta spp* (SANCHEZ et al., 1992) pode ser explicada, em parte, pela presença de enzimas trombina-like em sua constituição, as quais liberam fibrinopeptídeos A e B das cadeias α e β do fibrinogênio humano (MAGALHÃES et al., 2003), formando conseqüentemente um coágulo de fibrina.

A peçonha de *L. muta spp*. apresenta padrão de envenenamento similar ao acidente botrópico, com características neurotóxicas e hematóxicas. Aguiar et al. (1996), isolaram a proteinase LMR-47 com associação das técnicas de eletrofocalização e filtração em gel em HPLC. Classificada como serinoprotease, a enzima assemelha-se estrutural e funcionalmente à girotoxina encontrada em peçonhas de *Lachesis muta muta*, *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus adamanteus*. Estudos realizados por Otero et al. (1998) mostram que quando comparadas, as peçonhas brutas de *L. m. muta*, *L. m. stenophrys* e *L. m. rhombeata* apresentam padrões farmacológicos parecidos, embora as atividades coagulantes e hemolíticas desta última serpente sejam bem mais evidentes. A dose coagulante mínima, definida como a quantidade mínima de peçonha necessária para coagular o plasma em 60 segundos, foi de 2,5 μg para a peçonha de *L. m. rhombeata*, comparados com 8,7 μg para a de *L. m. muta*. No teste hemolítico, no qual a dose hemolítica mínima (DHM) é definida como a quantidade mínima de peçonha necessária para induzir halo de hemólise de 20 mm diâmetro, a DHM determinada para a peçonha de *L. m. rhombeata* foi de 5,9 μg , e de 26,0 μg para a peçonha de *L. m. muta*.

Fuly et al. (2007) mostram em seu trabalho que lisofosfatidilcolina é gerada pela atividade enzimática da fosfolipase A_2 isolada da peçonha de *Lachesis muta sp*. A lisofosfatidilcolina pode modular o efeito de linfócitos *Natural Killers*, ativar a enzima fosfocinase C, além de ter envolvimento importante na aterosclerose e em doenças inflamatórias. Além de fosfolipase A_2 (FULY et al., 2007, DAMICO et al., 2007), a peçonha de *L. muta* apresenta lectinas (DE SIMONE et al., 2006), enzimas trombina-like (MAGALHÃES et al., 2006) e peptídeos inibidores de bradicinina (GRAHAM et al., 2005).

Estudos mostram que o edema induzido por peçonha de *Lachesis muta rhombeata* em pata de rato é dose dependente, com hemorragias em doses maiores que 50 ng/g. Além disso, o edema provavelmente depende da liberação de aminas bioativas no sítio de envenenamento, pois o pré-tratamento com metilsergida, pirilamina, indometacina, dexametasona e L-NAME promovem redução do edema quando comparado com o controle (SOARES DE MOURA et al., 1998).

Até o momento, a terapia específica para o tratamento de envenenamentos por serpentes é a soroterapia, embora a sua eficiência esteja relacionada principalmente com a quantidade de peçonha injetada e com o tempo decorrido entre o acidente e o início do tratamento (FRANÇA, 1998). Apesar da peçonha de *Lachesis* apresentar menor toxicidade e letalidade quando comparada com a de outras viperídeos, a quantidade de veneno injetada em cada acidente laquético é grande, e por isso são exigidos tratamentos sorológicos com alta especificidade e capacidade de neutralização. A via de administração do soro anti-laquético, ou anti-botrópico-laquético é a via intravenosa e, em casos de acidente laquético comprovados e na falta dos soros específicos, o tratamento deve ser realizado com soro anti-botrópico, não obstante este não neutralize de maneira eficaz a ação coagulante do veneno laquético (FUNASA, 2001).

A presença de componentes imunossupressores na peçonha de *L. muta sp.*, em parte, justifica a menor capacidade de indução de anticorpo em cavalos, quando comparada com a de outras peçonhas. O soro antibotrópico neutraliza o equivalente a 180 vezes a DL_{50} para a peçonha de *Bothrops*; o soro anticrotálico neutraliza 250 vezes DL_{50} desta peçonha, enquanto o soro anti-laquético neutraliza somente cinco vezes a DL_{50} da peçonha de *Lachesis muta*. (STEPHANO et al., 2005).

1.3. Potencial biotecnológico de venenos e peçonhas

Ao longo do tempo, diferentes animais tem aprimorado suas técnicas de autodefesa e caça e dentre estas técnicas, está a produção de venenos e peçonhas. Há uma classificação que difere os animais venenosos dos animais peçonhentos, sendo que estes últimos possuem um aparelho específico, como dentes e agulhões para a introdução do veneno de forma ativa na presa, enquanto que os primeiros não o possuem (FIOCRUZ, 2011). As serpentes sempre despertam curiosidade, medo ou respeito, principalmente pelo perigo representado pela sua peçonha. No entanto, não só a peçonha de serpentes tem sido usada para pesquisa, seja do

ponto de vista da melhoria e entendimento nas intoxicações, seja para o desenvolvimento de fármacos. Peçonhas e venenos de outros animais também tem sido estudados exaustivamente.

Devido à sua alta especificidade para diferentes alvos fisiológicos, como componentes da cascata de coagulação sanguínea (AKAO et al., 2010) e sistema complemento (OH et al., 2010), várias toxinas presentes nestes venenos ou peçonhas foram isoladas e caracterizadas, tornando-se ferramentas importantes para o estudo de diferentes sistemas biológicos. Estes componentes tóxicos são diversificados tanto química quanto funcionalmente, e incluem alcalóides (CLARKE, 1997), esteróides (TIAN et al., 2010) e compostos proteicos como peptídeos, enzimas e outras proteínas e são encontrados tanto na peçonha de animais marinhos como anêmonas (PEIGNEUR et al., 2011) e cones (BRUCE et al., 2011), como em peçonhas de animais terrestres como escorpiões, aranhas e serpentes (BARRAVIERA, 1994).

Vários componentes biologicamente ativos e com elevado potencial biotecnológico foram isolados da peçonha de animais marinhos. No Filo *Mollusca*, tem-se como representante o caracol marinho em forma de cone *Conus magnus*, do qual se isolou o peptídeo SNX-111, análogo da ω -conotoxina MVIIA. Este peptídeo é utilizado como potente analgésico em pacientes com câncer, AIDS e em espasmos severos decorrentes de lesões medulares (MILIJANICH, 1997; PENN e PAICE, 2000; RIDGEWAY et al., 2000).

Estudos importantes têm sido desenvolvidos com representantes da Classe Arachnida, como aranhas e escorpiões. A injeção da peçonha da aranha *Parawixia bistriata* em cupins produz uma paralisia irreversível de modo dose-dependente (FONTANA et al., 2000). No entanto, a injeção intracerebroventricular dessa peçonha em ratos resultou em efeito neuroprotetor, pois diminuiu a ocorrência de crises tônico-clônicas induzidas por picrotoxina, bicuculina e pentilenotetrazol (CAIRRÃO et al., 2002).

Neurotoxinas são os componentes mais importantes de peçonha de escorpiões e afetam os mecanismos de permeabilidade iônica de membranas excitáveis pela interação específica com canais para Na^+ , K^+ , Ca^{2+} e Cl^- (ISMAIL, 1995; POSSANI, et al., 1999). As neurotoxinas mais estudadas são aquelas específicas para canais para sódio (POSSANI et al., 1999) e canais para potássio (TYTGAT et al., 1999), embora peptídeos ligantes de canais para cálcio e cloro também tem sido descritos (VALDIVIA et al., 1992; De BIN et al., 1993).

Sabe-se que várias toxinas isoladas de peçonhas de escorpião são capazes de inibir canais para K^+ dependentes de voltagem do tipo Kv 1.3 e que os mesmos podem ter um papel crucial na patogênese da esclerose múltipla e em doenças autoimunes. Portanto, estes inibidores seletivos de Kv1.3 podem representar uma terapia adequada para o tratamento da

esclerose múltipla e de outras doenças auto-imunes, como diabetes tipo 1, psoríase e artrite reumatóide (BEETON et al., 2001; 2003).

Secreções cutâneas de muitas espécies de anuros (sapos e rãs) são uma rica fonte de peptídeos com atividades microbianas de largos espectro. Moore et al. (1991) relatam a presença de peptídeos antimicrobianos no extrato do estômago de *Xenopus laevis* e nove desses peptídeos foram purificados e caracterizados. Esta classe de peptídeos denominados megaininas também foi encontrada na pele e mostram atividade antibacteriana contra *E. coli*. Buforin I é um peptídeo, que foi isolado pela primeira vez a partir de tecido do estômago sapo da Ásia denominado *Bufo bufo gargarizans*. Cho et al. (2009) mostraram que buforinas possuem ação anti-endotoxina e atividades anti-cancer, tornando estes compostos atraentes para aplicações farmacêuticas.

Além de elucidar mecanismos fisiológicos, estudos realizados com toxinas isoladas da peçonha de diferentes animais levaram ao desenvolvimento de diversos medicamentos, que são atualmente utilizados na terapia de patologias importantes como diabetes, esclerose múltipla e doenças cardiovasculares (LEWIS e GARCIA, 2003).

Selantes de fibrina são adesivos teciduais amplamente usados em uma variedade de aplicações clínicas. Os produtos comercialmente disponíveis são sintetizados a partir de trombina bovina e fibrinogênio humano e tem como desvantagens a transmissão de doenças infecciosas, além de estimular a presença de anticorpos contra a trombina bovina. Como alternativa foi desenvolvido um novo selante, cujo componente principal é uma serino-proteinase extraída da peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. A aplicabilidade deste selante foi testada em animais e humanos, com resultados benéficos, podendo ser utilizado como adjuvante em procedimentos de sutura convencional (BARROS et al., 2009).

1.4. Diferentes componentes das peçonhas de serpente

Além de ser usada primordialmente para o ataque, a peçonha da serpente exerce função de imobilização da vítima e facilita a digestão do tecido atacado (KARALLIEDDE, 1995; MENEZES, 2006). Estas atividades são devidas à presença de uma mistura complexa de componentes inorgânicos como cátions: Ca^{2+} , Zn^{2+} , Fe^{2+} , Mg^{2+} , Mn^{2+} , Cu^{2+} , K^+ , Na^+ , Co^{2+} (FRIEDERICH, 1971; BJARNASON e FOX 1994) e orgânicos como polipeptídeos, carboidratos, lipídeos, aminas biogênicas, nucleotídeos e aminoácidos (BJARNASON e FOX 1994; SOUZA, 2000). Geralmente as proteínas estão presentes em grande concentração nas peçonhas, podendo chegar a 90% do seu peso seco (DALMORA, et al., 1992). Dentre as

proteínas, existe grande variedade de enzimas, como fosfolipases A₂ (PLA₂), hialuronidasas, metaloproteases, serinoproteases e L-aminoácido-oxidases (LAAO) (CARDOSO, et al., 2003).

Peçonhas de serpentes possuem várias enzimas que agem em substratos com ligações éster-carboxílicas como fosfolipídeos, acetilcolina e arilacetato. Entre essas enzimas, as fosfolipases e as acetilcolinesterases tem funções biológicas importantes e merecem muitos estudos (IWANAGA e SUZUKI, 1979).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) são enzimas cálcio-dependentes que hidrolisam duas ligações ester de 1,2-diacil-3sn-fosfoglicerídeos. São classificadas em quatro classes, sendo que as PLA₂ das classes I e II e III apresentam baixa massa molecular (13,000–18,000 Da), e as PLA₂ da classe IV são intracelulares, citosólicas e tem alta massa molecular (85000 Da) (SIX & DENNIS, 2000). Apresentam alta variedade de atividades farmacológicas como neurotoxicidade pré-sináptica e pós-sináptica, miotoxicidade, cardiotoxicidade, efeitos anticoagulantes, convulsivantes, hipotensivas, hemolíticas e hemorrágicas além de efeitos indutores de edema (HUANG et al., 1997).

As hialuronidasas são enzimas que catalisam a clivagem de ligações glicosídicas de certos mucopolissacarídeos básicos dos tecidos conectivos animais, como ácido hialurônico e sulfato sódico de condroitina A e C (IWANAGA e SUZUKI, 1979). Conhecidas como “fator de espalhamento” auxiliam na digestão do tecido e conseqüentemente na difusão da peçonha. Hialuronidasas podem apresentar tanto atividade promotora quanto supressora de tumor. Lokeshwar e Selzer (2000) mostraram que se bloqueando a expressão de hialuronidase no câncer de próstata e de bexiga diminui-se a proliferação de tumor em até quatro vezes, devido ao estacionamento da divisão celular na fase GM-2.

As metaloproteases presentes em peçonha de serpentes apresentam atividades hemorrágicas *in vivo* devido a sua ação proteolítica sobre o fibrinogênio, fibrina e membranas basais dos capilares sanguíneos (OWNBY et al., 1974). Novas patologias relacionadas com a atividade de metaloproteases de peçonha de serpentes foram estudadas e novos substratos identificados para a sua ação proteolítica, como colágenos e fibonectina (SERRANO et al., 2006). Essas enzimas são classificadas em quatro classes, baseadas na presença ou ausência de vários domínios: as metaloproteases da classe PI, caracterizadas pela presença do domínio metaloprotease apenas, as metaloproteases da classe PII compostas dos domínios metaloprotease mais domínio desintegrina, as metaloproteases da classe PIII com o domínio metaloprotease, o domínio desintegrina-símile mais o domínio rico em cisteína e as metaloproteases do grupo IV, as quais apresentam a estrutura das metaloproteases do grupo

PIII mais os domínios lectina-símile (FOX e SERRANO, 2009). Além dessas enzimas estudadas, as peçonhas de serpentes possuem também L-aminoácido oxidase.

1.5. L-aminoácido oxidase (LAAO)

L-aminoácido-oxidases (LAAOs) são flavoenzimas enantiosseletivas que catalisam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos, produzindo um intermediário iminoácido, através da redução do cofator flavina. O iminoácido sofre uma hidrólise não enzimática e produz α -cetoácidos, além de amônia. Em uma reação paralela ocorre a reoxidação do cofator por oxigênio molecular, produzindo água oxigenada. (Figura 11). Sua classificação enzimática é EC 1.4.3.2; EC 1. Oxidorredutases, EC 1.4. Agem no grupo doador de elétrons (CH-NH₂) EC 1.4.3 tem o oxigênio comoceptor de elétrons: **EC 1.4.3.2 L-amino-acid oxidase.**

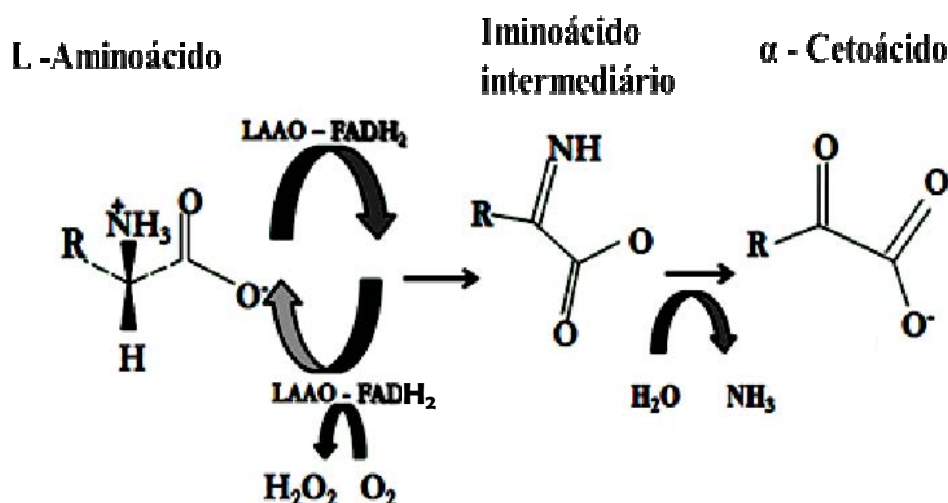


Figura 11. Reação de desaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido catalisado por uma LAAO.

1.5.1. Massa Molar e ponto isoelétrico de diferentes LAAOs

LAAOs estão presentes em diferentes organismos. Embora todas catalisem a clivagem de L-aminoácidos, existem pequenas diferenças entre elas, como exemplo a massa molar. Segundo Du e Clemetson (2002), elas podem apresentar de 110 a 150 kDa, quando determinadas por gel filtração, ou de 50 a 70 kDa, quando medidas por eletroforese em gel de poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), tanto em condições redutoras como não redutoras. Alves et al. (2008) encontraram para LAAO de *B. atrox* um valor de

massa molar de 67 kDa, determinada por SDS-PAGE, semelhante ao encontrado por Izidoro et al. (2006) para a LAAO de *B. pirajai*, 66 kDa, e para a LAAO de *Ophiophagus hannah*, 65 kDa (LEE et al., 2011).

Sun et al. (2010) encontraram uma pequena diferença entre a massa molar da amostra de LAAO de *Agkistrdon blomhoffi usurensis* medida por SDS-PAGE (65 kDa) e a massa molar da mesma amostra determinada por espectrometria de massas (62,2 kDa), mostrando que se pode ter uma diferença dependendo de como a amostra foi processada. Segundo Macheroux et al. (1999) cada monômero pode apresentar em média 3,7 kDa de glicosilação, o que justifica as diferenças de massa molar.

Para exercer sua atividade LAAOs podem apresentar-se como dímeros, por isso, apresentando a massa molar entre 110 e 150 kDa. Pawelek et al. (2000) mostraram que a LAAO de *Calloselasma rhodostoma* apresenta-se como um homodímero com 55 kDa por protômero¹.

Embora presente em vários organismos, as LAAOs purificadas de peçonha de serpentes são geralmente glicoproteínas ácidas ou básicas, (pI = 4,4 - 8,5) (DU e CLEMETSON, 2002; CURTI et al., 1992; AHN et al., 1997). Tan e Swaminathan (1992) encontraram um valor de ponto isoelétrico de 8,12 para a LAAO de *N. n. kaouthia*. O pI encontrado para a LAAO de *B. atrox* foi de 4,4 (ALVES et al., 2008) e para a LAAO de *B. pirajai* foi de 4,4 (IZIDORO et al., 2006). Sánches e Magalhães(1991) também isolaram uma LAAO de *Lachesis muta muta* a qual apresentou um pI de 5,2.

1.5.2. Aspectos Estruturais de LAAOs

A estrutura da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* foi determinada por Pawelek et al. (2000) na presença de dois ligantes, citrato e o-aminobenzoato. A LAAO de *Calloselasma rhodostoma* é constituída por quinze α -hélices e vinte e duas folhas β pregueadas, que se organizam em três domínios distintos, sendo um domínio para a ligação do FAD, um domínio para a ligação do substrato e um domínio helicoidal (Figura 12).

O sítio ativo da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* está localizado na base de um túnel que se estende por 25Å desde a superfície até o interior da enzima, sendo que na entrada deste túnel existem moléculas de água (PAWELEK et al., 2000). O formato deste túnel pode variar em diferentes oxidases. A estrutura da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* ligada com

¹ Protômero é cada subunidade de proteína oligomérica. (NELSON e COX, 2008).

seu substrato L-fenilalanina revela a formação de um túnel em formato de “Y” (Figura 13) (MOUSTAFA et al., 2002), e a estrutura do túnel de L-glutamato-oxidase obtida de *Streptomyces SP* X-119-6 lembra o formato da letra “U”; estas duas entradas distam 20Å do sítio catalítico (ARIMA et al., 2009).



Figura 12. Estrutura de L-amino ácido oxidase de *Caloselasma rhodostoma* complexada com L-fenilalanina. Adaptado de Moustafa et al. (2006).

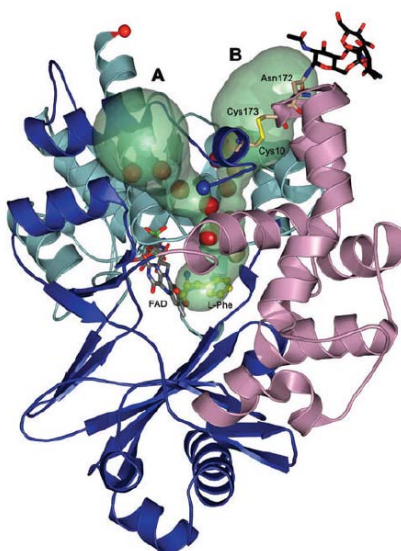


Figura 13. Sítio ativo em formato de Y da L-aminoácido oxidase da *Caloselasma rhodostoma*. Adaptado de Moustafa et al. (2006)

A reação de clivagem de L-aminoácidos por LAAOs depende da oxidação do seu cofator, que comumente é o FAD. A estrutura do sítio catalítico de LAAO de *Caloselasma rhodostoma* complexada com citrato e com o cofator FAD está representada na Figura 14. Essa figura também destaca a importância dos resíduos Asn 208, Tyr 372, His 223 e Arg 90 no sítio catalítico. Além do cofator FAD, pode se observar a presença de FMN como grupo

prostético na estrutura de LAAO, como foi mostrado por Souza et al. (1999) em experimentos de ressonância magnética nuclear, mas não se sabe se esta diferença pode influenciar na estereoespecificidade da enzima.

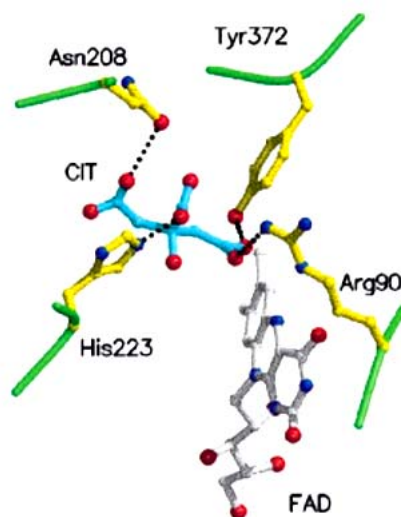


Figura 14. Sítio catalítico de LAAO de *Calloselasma rhodostoma* complexado com citrato. Em detalhe, a presença do FAD como cofator. As linhas pontilhadas representam ligações de hidrogênio. Em amarelo, os resíduos importantes para estabilização do substrato. Adaptado de Pawelek et al. 2000.

Por meio deste trabalho, Pawelek et al. (2000) também mostraram que o anel isoaloxazolina do FAD fica posicionado entre a interface do domínio para a ligação do FAD e o domínio para a ligação do substrato, como em outras enzimas que apresentam o FAD como cofator. Matevi et al. (1996) mostraram a existência de uma molécula de água interagindo, por meio de ligação de hidrogênio, com o nitrogênio 5 da isoaloxazolina e com um aminogruppo da cadeia lateral de uma lisina (Lys 300), evidenciando a importância da molécula de água no ataque hidrolítico do intermediário iminoácido.

1.5.3. Sítios de Glicosilação

Em LAAO de *Calloselasma rhodostoma* pode-se observar dois sítios de glicosilação, sendo um no domínio helicoidal e o outro no domínio de ligação ao substrato (PAWELEK et al., 2000), presentes sobre a Asn 172 e a Asn 361. Estudos mostram que a presença da glicosilação é um fator de *docking*, ou seja, melhora a orientação para a interação da LAAO com a superfície das células. Tal fato aumenta a concentração de peróxido de hidrogênio no local de ligação da LAAO com a célula, o que por consequência aumenta a toxicidade (SUHR e KIM, 1996).

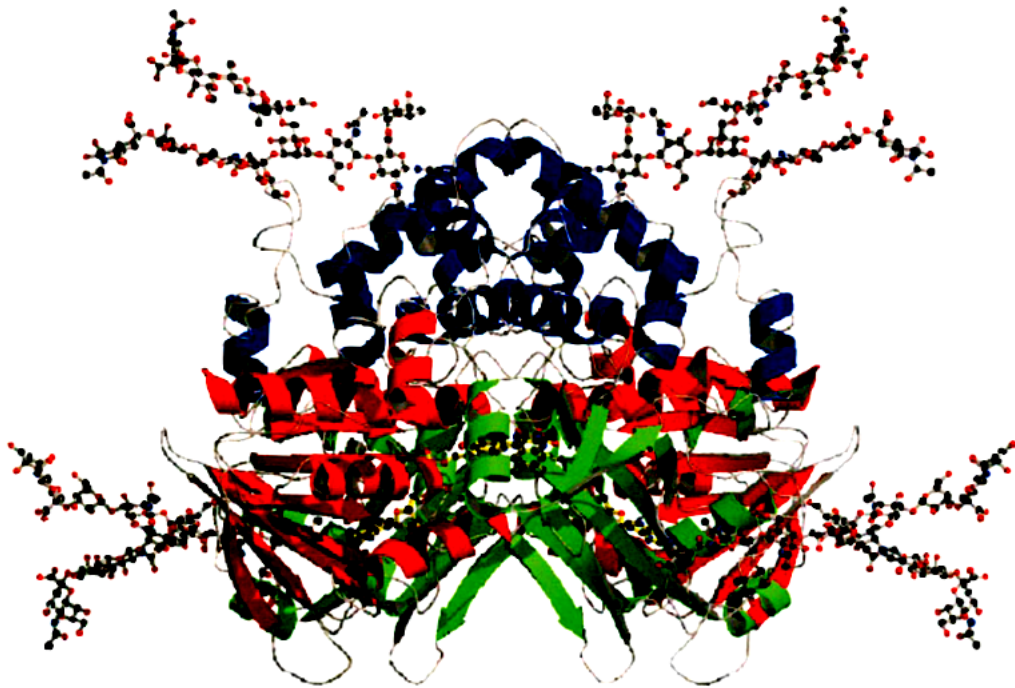


Figura 15. Modelo estrutural dimérico de LAAO de *Caloselasma rhodostoma* com os sítios de N-Glicosilação. (GEYER et al., 2001).

Existe uma grande semelhança entre as LAAOs com relação ao N-terminal da sequência linear da enzima. A sequência dos resíduos amino-terminais da LAAO de *Agkistrodon contortrix laticinctus* foi determinada e revelou que a mesma apresenta grande homologia com a sequência da LAAO de *Caloselasma rhodostoma* (PONNUDURAI et al., 1994).

1.5.4. Propriedades da cinética enzimática de LAAO

LAAOs provenientes de diferentes organismos tem mostrado preferência em clivar aminoácidos de cadeia lateral hidrofóbica, especialmente aromática. Wei et al. (2007) mostraram, baseados nas constantes de especificidade de LAAO de *A.b.ussurensis* frente a diferentes substratos, que os aminoácidos L-Phe, L-Tyr e L-Leu são clivados preferencialmente. Mandal e Bhattacharyya (2008) purificaram duas isoformas de LAAO de *D. r. russelli* e as duas isoformas clivaram preferencialmente L-Phe, apresentando K_m de 66,5 μ M e 49,3 μ M.

Quanto ao pH do meio reacional, foi demonstrado que LAAOs não são ativas em condições extremas. O pH do meio reacional deve ficar entre 7 e 8. LAAO de *D. r. russelli* perde totalmente a atividade quando incubada em meios com valores altos de pH (MANDAL

e BHATTACHARYYA, 2008) e a LAAO *Naja naja kaouthiaand* tem um valor ótimo de pH de 8,5 para sua atividade (TAN e SWAMINATHAN, 1992).

1.5.5. Atividades farmacológicas de LAAOs

Agregação plaquetária

As plaquetas são fragmentos de megacariócitos, anucleados como as hemácias, e contêm RNA, mitocôndrias, ADP e ATP, fibrinogênio, histamina, serotonina e fator de Willebrand. As plaquetas estão intimamente ligadas com a hemostasia primária, processo de formação de coágulo branco, frente a uma lesão endotelial. A hemostasia ocorre em etapas distintas que envolvem vasoconstrição, devida a liberação de tromboxana A₂, a adesão das plaquetas ao endotélio vascular por meio do colágeno, ativação plaquetária, por meio de liberação de substâncias como produtos da oxidação do ácido aracdônico pela via da cicloxigenase e, finalmente, a agregação plaquetária, com a formação de pontes de fibrinogênio. (BERNARDI e MOREIRA, 2004; BLOOM e DAVIES, 1967).

Não está bem definido o papel da LAAO nos processos de agregação plaquetária. Segundo SAMEL et al. (2008), a LAAO de *Naja naja oxiana* inibe de forma dose-dependente a agregação plaquetária, tanto por indução por ADP (0,094μM), quanto na indução por colágeno (0,036μM). Esta inibição foi diminuída com a adição de catalase devido à atividade desta enzima sobre o peróxido de hidrogênio

Em seus experimentos, Li et al. (2008) mostraram que com uma dose de 15μg/mL a LAAO de *Naja atra* também inibe a agregação plaquetária em plasma rico em plaquetas, porém ativa diretamente plaquetas lavadas, tendo sua ação inibida em presença de catalase. Com uma dose menor de LAAO de *Naja atra* (1,5 μg/mL) não há agregação plaquetária. No entanto, a presença de LAAO de *Naja atra* promove a potenciação da atividade da H₂O₂, na agregação plaquetária. Embora, como já citado, a ação da LAAO de *Naja atra* também seja inibida pela ação da catalase, Li et al. (2008) mostraram ligação da LAAO de *Naja atra* às plaquetas em experimentos de citometria, marcando a enzima com fluorescein isotiocianato (FITC). LI et al. (2008) também observaram que o congelamento e descongelamento não afetam a atividade enzimática de LAAO de *Naja atra*, porém diminui a atividade de agregação plaquetária.

Dessa forma, por mais que a agregação plaquetária possa ocorrer pela presença de H₂O₂, a qual promove a formação de tromboxana A₂ (DU e CLEMETSON, 2002), a ligação da LAAO na célula também exerce um papel fundamental na agregação plaquetária.

Apoptose

Devido a sua natureza altamente regulada, a apoptose tornou-se um alvo para pesquisa científica. Este tipo de morte celular é muito conservado ao longo da evolução e desempenha um importante papel fisiológico no desenvolvimento embrionário e envelhecimento (LOCKSHIN e ZAKERI, 2007). Vários tipos de estímulos de estresse celular foram mostrados para desencadear a apoptose, incluindo quimioterápicos, radiação, estresse oxidativo. As caspases, uma família de cisteíno-proteases, agem como moléculas efetoras e são comuns em várias formas de apoptose (ASHKENAZI, 2008).

ANDE et al., (2008) mostram que LAAO de *Calloselasma rhodostoma* na concentração de 1,2 μ M induz apoptose em *Saccharomyces cerevisiae*, mesmo quando a enzima sofreu processo de desglicosilação por neuraminidase.

Além de promover apoptose em leveduras, LAAO promove apoptose em outras linhagens de células, como HeLa (uma linhagem de células de tumor cervical) (ZHANG et al., 2004) com uma dose de 0,5 μ g/mL de LAAO de *Agkistrodon halys pallas* e em linhagens HL-60, (linhagem de células leucêmicas) com uma dose de 25 μ g/mL de LAAO de *Agkistrodon contortrix laticinctus* (SOUZA et al., 1999).

Edema

Estudos com LAAO de *Bothrops alternatus* (STÁBELI et al., 2004), mostram a indução de edema na pata de camundongo na concentração de 1 mg/mL.

Hemorragia

Os casos de hemorragia são bastante comuns em casos de ofidismo. Comumente a hemorragia é induzida por metaloproteinases que hidrolisam as proteínas da membrana basal dos capilares. Em consequência disso, as células endoteliais são afetadas, ocorrendo então o rompimento da parede capilar (RUCAVADO et al., 2002).

A LAAO de *Daboia russelli* (ZHONG et al., 2009) possui atividade hemorrágica em camundongos. A LAAO de *Bothrops alternatus* apresenta baixa atividade hemorrágica, sendo que não se observa hemorragia para doses menores que 100 μ g (STÁBELI et al., 2004).

Atividade antiparasitária

As doenças negligenciadas são um grande problema mundial, dado que durante cada ano, são registradas mais de um milhão de mortes. Entre as principais doenças, está a Doença de Chagas e a Leishmaniose (PONTES, 2011).

A Doença de Chagas apresenta duas fases, a aguda e a crônica. A fase aguda é caracterizada principalmente por alta parasitemia e por afecções cardíacas, tendo como principais manifestações clínicas as febres prolongadas, cefaleias, mialgias, astenia e edema de face ou membros. Se a doença é transmitida pelo vetor (Triatomídeos hematófagos), podem ocorrer sinais de porta de entrada, conhecido como Chagoma de inoculação (furúnculo que não supura) ou sinal de Romaña (edema bipalbebral, unilateral). Já a fase crônica é caracterizada pela diminuição da parasitemia e possível evolução para forma indeterminada, na qual o paciente apresenta sorologia positiva sem alteração de exames específicos. Na fase crônica o paciente também pode apresentar a forma cardíaca (afecções do coração) forma digestiva, forma associada (afecções do coração e do trato digestório) e a forma congênita, passada de mãe contaminada para filho (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). Deolindo et al., (2010) mostraram em seus trabalhos que uma fração contendo LAAO de *B. jararaca* demonstrou ser tóxica para as formas epimastigotas do parasita *T. cruzi* com uma DL₅₀ de 4,3 µg/mL.

A Leishmaniose, uma doença infecciosa não contagiosa, também tem como vetor um artrópode. Trata-se da fêmea de flebotomídeos do gênero *Lutzomia*, a qual quando pica o humano, transmite os protozoários do gênero *Leishmania*. Na forma tegumentar da doença, são desenvolvidas feridas na pele, as quais são normalmente indolores. Essas feridas são conhecidas como Úlcera de Bauru, Nariz de Tapir ou Botão do Oriente. As espécies mais comuns encontradas são *L. braziliensis*, *L. amazonensis* e *L. guyanoensis*. Na forma visceral da doença, podem ocorrer hepatoesplenomegalia, além de complicações decorrentes da contaminação das feridas vicerais. As mais frequentes são de natureza infecciosa bacteriana, destacando-se as afecções pleuropulmonares, geralmente precedidas de bronquites, complicações intestinais, infecção urinária, hemorragias e anemia aguda (BRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2010). França et al. (2007) estudaram o efeito de LAAOs de diferentes *Bothrops* sobre *Leishmania braziliensis* e mostraram que a dose de 0,2 µg/mL já é tóxica para essa espécie. Já Rodrigues et al. (2009) mostraram que LAAO de *Bothrops pauloensis* é tóxica para diferentes espécies de *Leishmania*. Para *L. braziliensis*, a dose tóxica foi de 1,29 µg/mL, para *L. donovani*, 1,03 µg/mL e para *L. amazonensis*, 1,29 µg/mL.

Neste estudo objetivamos isolar e caracterizar a LAAO presente na peçonha de *Lachesis muta*. As motivações para o mesmo foram as incertezas sobre o mecanismo pelo qual LAAOs agem nos quadros de envenenamento por serpentes, seu elevado potencial como ferramenta para estudar diferentes processos fisiológicos, tais como edema, mionecrose e apoptose, bem como sua possível aplicação para o desenvolvimento de medicamentos, para combater o câncer, parasitoses, entre outras enfermidades.

2. Objetivos

2.1. Objetivos Gerais

Isolamento, caracterização bioquímica, funcional, enzimática e estrutural da L-aminoácido-oxidase presente na peçonha de *Lachesis muta*.

2.2. Objetivos Específicos

- ✓ Padronização de técnicas de purificação de LAAO de peçonha de *Lachesis muta*.
- ✓ Caracterização bioquímica da enzima pela avaliação da atividade enzimática, determinação do ponto isoelétrico, seqüenciamento amino terminal, determinação de massa molecular e determinação dos seus parâmetros cinéticos (K_m e V_{max}).
- ✓ Determinação de atividades farmacológicas da enzima, pela avaliação de sua citotoxicidade em células de tumor, atividade sobre os parasitas *Trypanosoma cruzi* e *Leishmania braziliensis*, atividade tóxica em diferentes tecidos, como músculo esquelético, músculo cardíaco, pulmões e rins.
- ✓ Clonagem e sequenciamento do cDNA da LmLAAO.
- ✓ Determinação da estrutura tridimensional da LAAO por modelagem molecular, com base em estruturas de L-aminoácido-oxidases depositadas no Protein Data Bank.

3. Material e Métodos

3.1. Reagentes e Equipamentos

1. Acetonitrila grau CLAE – Merck;
2. Ácido trifluoroacético (TFA) – Sigma;
3. Água milli-Q – Millipore;
4. Água purificada obtida por osmose reversa – Gehaka;
5. Balança analítica – Ohaus;
6. Balança semi-analítica eletrônica de precisão modelo BG4400 – Gehaka;
7. Banho-maria modelo 100 – FANEM;
8. Cloreto de sódio – J.T. Baker;
9. C4 Analítica® (Vydac)
10. Coluna C4 (*Shodex Asahipack C4P-50 4E*)
11. Coluna Mono Q (Tricorn; GE Healthcare)
12. Espectrofotômetro modelo U-2001 – Hitachi;
13. Fonte de eletroforese EPS 3500XL – Pharmacia Biotech/GE;
14. L-Leucina (Sigma-Aldrich)
15. Leitor de microplacas Sunrise – Tecan;
16. Orto-fenilenodiamina (Sigma-Aldrich)
17. Padrão de massa molar (HMWS - GE cód. 17-0615-01)
18. Padrão de massa molar (LMWS - Sigma cód. M3913)
19. Peroxidase Horseradish (Sigma-Aldrich)
20. Peróxido de Hidrogênio (Synth)
21. Reagentes utilizados no sequenciador de proteínas – Wako;
22. Resina Affi-Gel Blue® (Bio Rad)
23. Resina Phenyl Sepharose (Amersham Biosciences)
24. Resina *Sephacryl S200*® (GE Healthcare)
25. *Sephacryl S-100*® (coluna pré-empacotada - Hiprep 16/60, GE Healthcare)
26. Sequenciador Automático de Proteínas, modelo PPSQ-33A – Shimadzu
27. Sistema Äkta Purifier UPC-10 – Amersham Biosciences/GE, detector UV-visível e condutivímetro;
28. Sistema purificador de água tipo milli-Q modelo Synergy UV – Millipore;
29. Sistema purificador de água tipo Osmose reversa modelo OS10LX – Gehaka;
30. Vidraria em geral.

Os demais reagentes ou equipamentos utilizados em colaboração com outros pesquisadores estão especificados em material e métodos. Todos os reagentes usados foram de grau analítico.

3.2. Peçonha

Toda a peçonha foi obtida por extração manual de *Lachesis muta* e foi fornecida pelo **Serpentário Bosque da Saúde, na cidade de Americana (Registro IBAMA: 647.998)**. A peçonha bruta permaneceu sob vácuo em dessecador com sílica a temperatura ambiente até que estivesse dessecada e após esse procedimento foi estocada a -20°C até o momento do uso.

3.3. Fracionamento da peçonha de *Lachesis muta* para obtenção de LmLAAO

Para o fracionamento da peçonha de *Lachesis muta* foram utilizados dois protocolos distintos, os quais apresentaram características peculiares, porém em ambos os casos, forneceram a LmLAAO purificada. Neste trabalho, estes protocolos de fracionamento serão apresentados como *Protocolo de Purificação 1* e *Protocolo de Purificação 2*.

3.3.1. Protocolo de purificação 1

Filtração em Sephacryl S-100® em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Aproximadamente 20 mg de peçonha de *L. muta* foram suspensos em 250 µL de tampão de eluição (Tris HCl 20mM mais NaCl 0,15M, pH 7,2), centrifugado a 3000 x g por 10 minutos a 4°C e o precipitado obtido foi diluído em 200 µL do mesmo tampão e novamente centrifugado 3000 x g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes obtidos foram reunidos e uma alíquota de 10 µL foi retirada para dosagem de proteínas pelo método da absorvância em 205nm/280nm (PETERSON, 1983). Dessa forma, foram aplicadas à coluna Sephacryl S-100® (Hiprep 16/60, GE Healthcare), 15 mg de proteína. A coluna foi previamente equilibrada com Tris HCl 20mM mais NaCl 0,15M, pH 7,0, e manteve-se vazão de 0,5 mL/min à temperatura de 25°C. A corrida cromatográfica foi feita de forma isocrática e finalizou-se em 1,0 VC (VC - volume de coluna – 160 mL) no mesmo tampão de equilíbrio, em sistema Äkta UPC10 (GE). Foram coletadas frações de 1,5 mL/tubo.

A Figura 16 mostra a estrutura da resina *Sephacryl*®, resina composta por alil-dextrana e N,N'bisacrilamida ligadas entre si de forma cruzada.

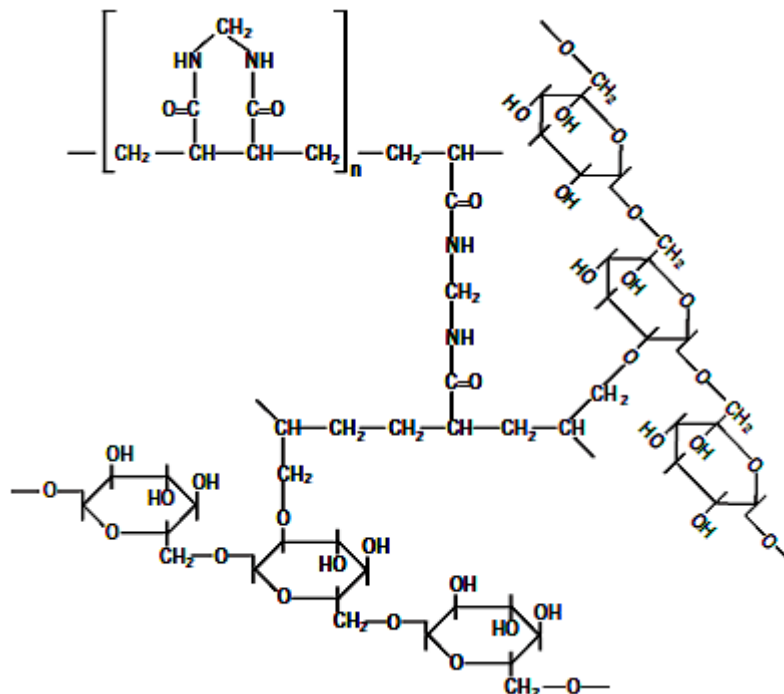


Figura 16. Estrutura parcial da resina Sephacryl®. Resina composta de ligações cruzadas entre alil-dextrana e N,N'bisacrilamida. Figura disponível em www.gelifsciences.com com data de acesso 10 de junho de 2011.

Troca iônica em Resina Mono Q® em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Uma resina de troca aniônica (Mono Q®, Tricorn: GE Healthcare), em coluna com dimensões 5/50 mm, e com volume de coluna (VC) de 1 mL foi usada para a purificação. A fase móvel utilizada constituiu-se de tampão Tris-HCl 20mM, pH 7,3 (eluyente A) e NaCl 1M em Tris-HCl 20mM, pH 7,3 (eluyente B). Para a cromatografia utilizou-se um gradiente segmentado de 0 a 100% de eluyente B (Figura 17). As amostras a serem aplicadas à coluna foram preparadas com 500 µL dos tubos com atividade LAAO recolhidos da fração SLm1 obtidos da filtração em *Sephacryl S-100*® (Figura 26). A cromatografia foi feita a 25°C no sistema Äkta UPC10 (GE) e foram coletadas frações de 1,0 mL. A absorvância foi determinada automaticamente em 280 nm.

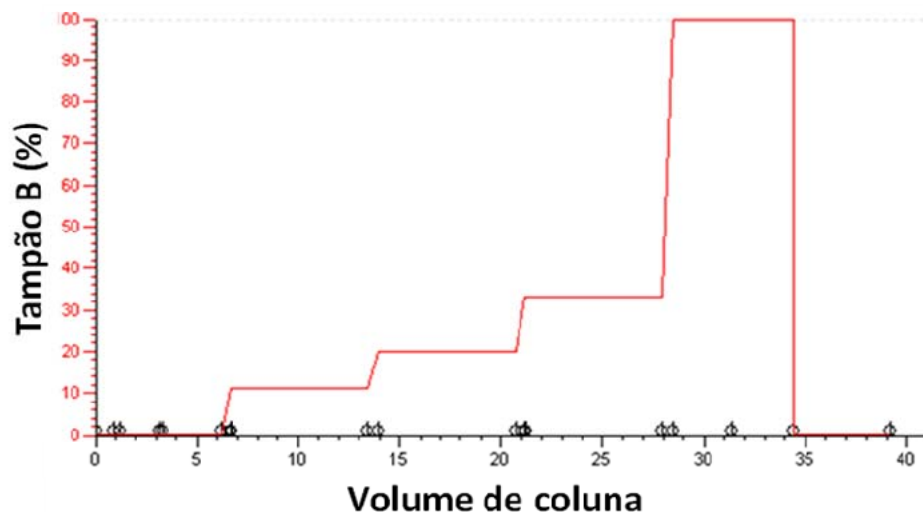


Figura 17. Método empregado na purificação de LmLAAO em Mono Q® por meio de Gradiente segmentado.

Cromatografia de fase reversa em coluna C4 em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A fração obtida da cromatografia em Mono Q® que apresentou atividade LAAO foi submetida a uma cromatografia de fase reversa, usando como eluentes TFA 0,1% (Solução A) e TFA 0,1% mais ACN 80% (Solução B) em gradiente de acetonitrila demonstrado na Figura 18. O volume de coluna da C4 Shodex Asahipack C4P-50 4E® é de 4,15 mL. As amostras foram preparadas com 900 µL do material eluído da Mono Q® e adicionados de 100 µL de TFA 0,1%. A cromatografia foi monitorada em 280 nm, realizada em 25°C e coletou-se 1 mL por tubo. Esta etapa cromatográfica foi realizada para confirmar a pureza da amostra a ser submetida ao seqüenciamento N-terminal e, adicionalmente, retirar o tampão na qual foi eluída da cromatografia em Mono Q®.

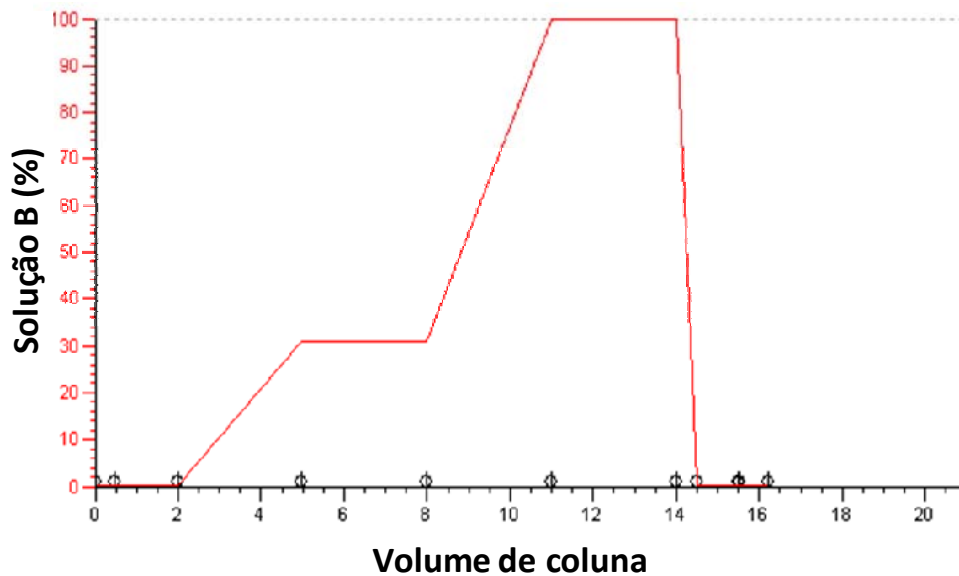


Figura 18. Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Shodex® por meio de gradiente segmentado.

3.3.2. Protocolo de purificação 2

Filtração em Sephacryl S-200® por Cromatografia em Baixa Pressão.

Aproximadamente 200 mg de peçonha de *L. muta* foram suspensos em 2 mL de tampão de eluição (Tris HCl 20mM mais NaCl 0,15M, pH 7,0), centrifugado a 3000 x g por 10 minutos a 4°C e o precipitado obtido foi diluído em 200 µL do mesmo tampão e novamente centrifugado 3000 x g por 10 minutos a 4°C. Os sobrenadantes foram reunidos, o volume completado para 3 mL com tampão de eluição e aplicados a uma coluna com resina Sephacryl S-200®. A cromatografia foi realizada em baixa pressão em cromatógrafo Bio Rad Biologic LP® à 25°C, em uma vazão de 0,5 mL/min. Foram coletadas frações de 6 mL e a absorvância foi monitorada automaticamente em 280 nm.

A corrida cromatográfica foi realizada de forma isocrática e finalizou-se em 1,0 VC (volume de coluna – 220 mL). A determinação da atividade LAAO (detalhada mais à frente) foi realizada do tubo número 1 (correspondendo a 31 mL de eluição pela coluna) ao tubo número 40 (correspondendo a 240 mL de eluição através da coluna) desta gel-filtração. Os tubos recolhidos com frações ativas foram submetidos à próxima etapa de purificação.

Interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose® por Cromatografia Clássica

A fração eluída da *Sephacryl S-200*® com atividade L-aminoácido oxidase foi submetida a uma cromatografia de interação hidrofóbica em resina *Phenyl-Sepharose*®. Para o preparo da amostra, foi adicionado NaCl à fração SpLm1 de forma que a molaridade de sal atingisse 1,5M. A amostra foi adicionada à coluna contendo *Phenyl Sepharose*® (volume de resina – 25 mL) equilibrada com Tris HCl 20mM na presença de NaCl 1,5M, à temperatura ambiente. A coluna foi eluída em gradiente de passos decrescentes com tampão Tris HCl 20mM e NaCl variando de 1,5M até 0 e finalizado com água deionizada, conforme Figura 19. Foram coletadas frações de 3 mL/tubo e a vazão foi mantida a 1 mL/minuto. As frações foram monitoradas a 280nm.

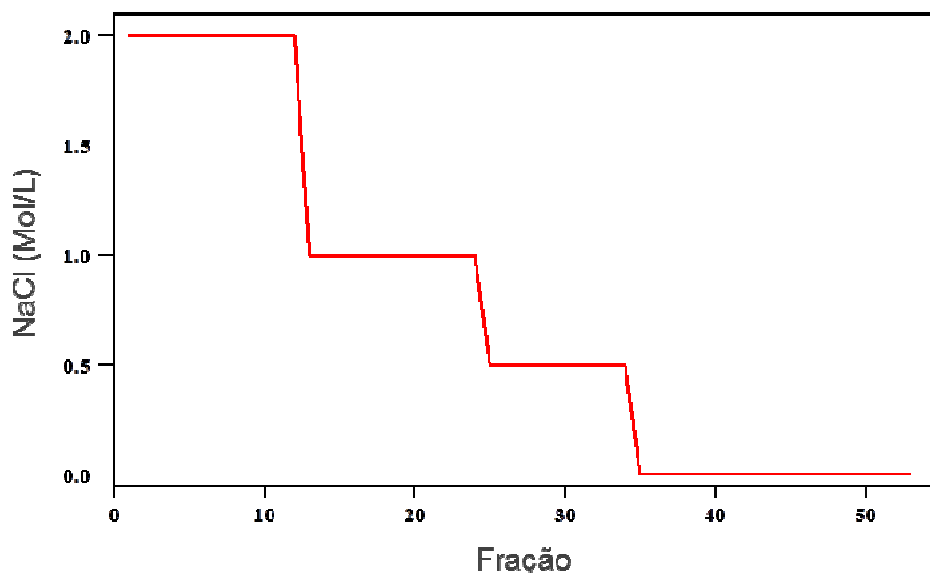


Figura 19. Método empregado na purificação de LmLAAO em Phenyl Sepharose® por meio de gradiente segmentado.

O ligante dessa resina é um grupamento fenil o qual pode fornecer tanto interações hidrofóbicas quanto interações aromáticas (Figura 20).

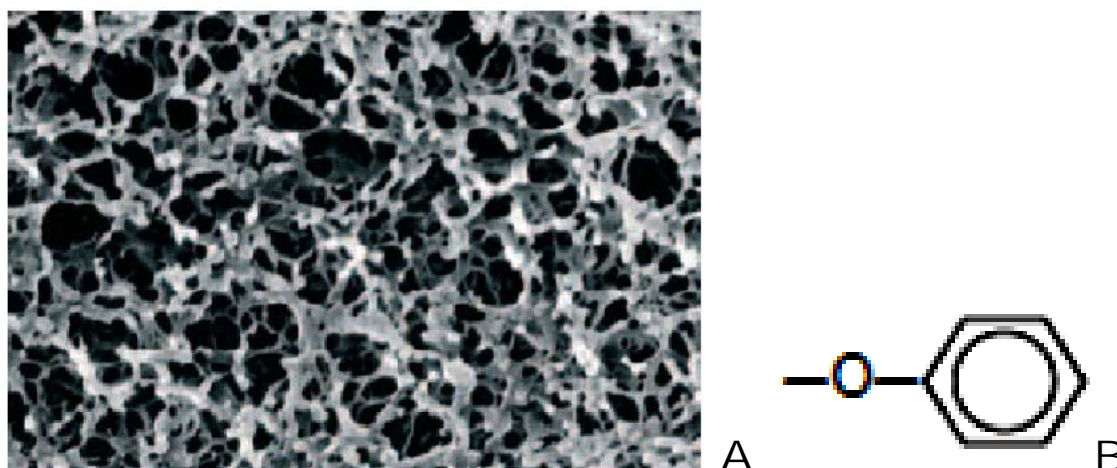


Figura 20. Estrutura da resina usada na cromatografia de interação hidrofóbica. **A** - estrutura da agarose intercruzada (Sefarose). **B** – Grupamento fenil, ligante da resina Fenil-Sepharose®. Ambas figuras disponíveis em: www.gelifesciences.com, data de acesso 23 de julho de 2011.

Cromatografia Líquida de Baixa Pressão em Resina Affi –Gel Blue®.

A fração com atividade L-aminoácido oxidase eluída da cromatografia de interação hidrofóbica em *Phenyl-Sepharose*® foi submetida a uma nova etapa cromatográfica em resina *Affi-Gel Blue*® (Bio Rad), volume de coluna, 20 mL. Os tampões de eluição foram Tris-HCl 20mM, pH 8,0 (tampão A) e NaCl 1,5 M em Tris-HCl 20mM, pH 8,0 (tampão B). A corrida foi realizada com gradiente segmentado de concentração de NaCl com o tampão B variando de 0 a 100%, conforme mostra a Figura 21. A cromatografia foi realizada em baixa pressão em cromatógrafo Bio Rad Biologic LP ® à 25°C, em uma vazão de 0,5mL/min. Foram coletadas frações de 8 mL e a absorvância foi monitorada automaticamente em 280 nm.

A Figura 22 mostra a estrutura da resina *Affi-Gel Blue*

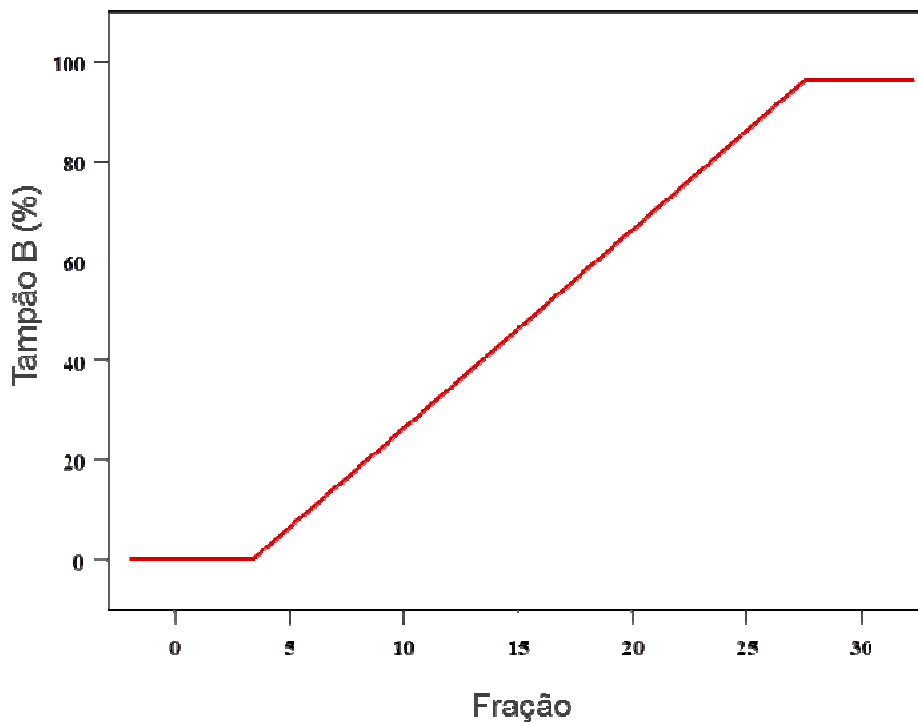
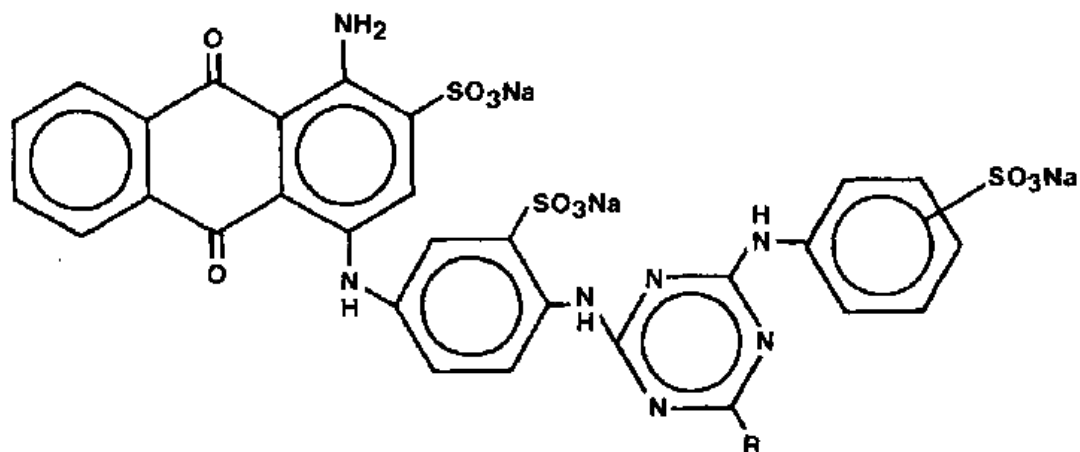


Figura 21. Método empregado na purificação de LmLAAO em Affi-Gel Blue® por meio de gradiente segmentado.



R = -Cl = Cibacron Blue

Figura 22. Estrutura química do corante da resina Affi-Gel Blue®. A matriz de agarose intercruzada contém ligado covalentemente o corante CIBACRON F3GA® (SUBRAMANIAN, 1994).

Fase reversa em coluna C4 Analítica Vydac em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

A fração obtida da cromatografia em *Affi-Gel*® que apresentou atividade LAAO foi submetida a uma cromatografia de fase reversa, usando como eluentes TFA 0,1% (Solução A) e ACN 80% em TFA 0,1% (Solução B), em gradiente de acetonitrila demonstrado na Figura 23. O volume de coluna da *C4 analítica Vydac*® é de 1,66 mL. As amostras foram preparadas com fração eluída da *Affi-Gel*® e adicionados de 100 µL de TFA 0,1%. A cromatografia foi monitorada em 280 nm e realizada em 25°C. Esta etapa cromatográfica foi realizada para confirmar a pureza da amostra a ser submetida à espectrometria de massas.

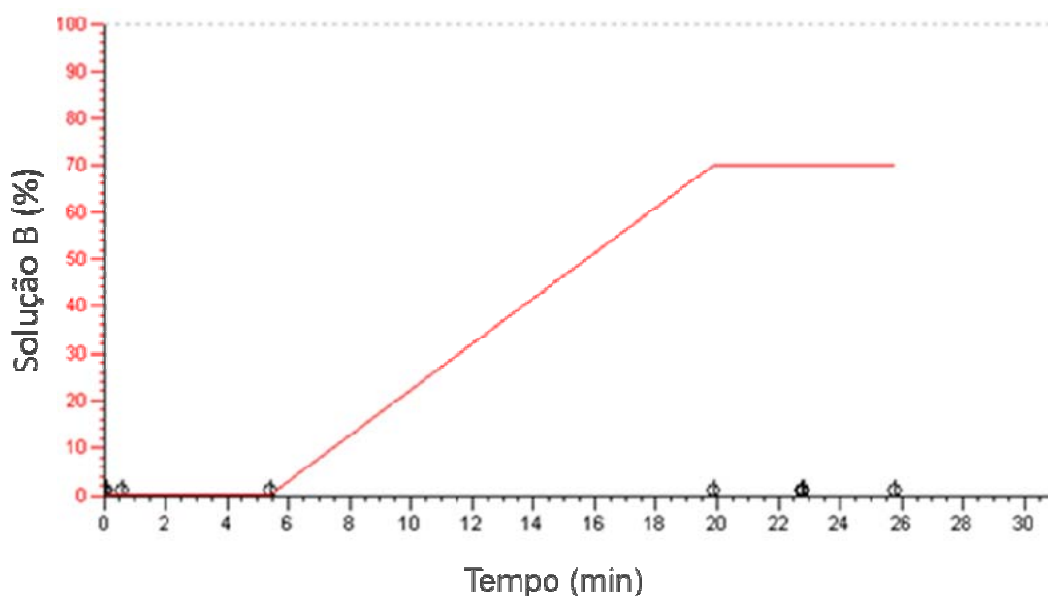


Figura 23. Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Analítica Vydac® por meio de gradiente segmentado

3.4. Ensaio de atividade L-aminoácido-oxidase

Para a determinação da atividade L-aminoácido-oxidase, o ensaio foi realizado em microplaca de 96 poços segundo Kishimoto & Takahashi (2001) com modificações. Ao contrário do tampão borato utilizado por Kishimoto & Takahashi (2001), os ensaios foram realizados com 90 µL de um meio reacional contendo Tris HCl 50 mmol/L, pH 8,0, L-Leucina 5 mmol/L, peroxidase de rabanete 5 U e 2 mmol/L de ortofenilenediamina, à 37°C em banho de água com temperatura controlada. A amostra contendo a LmLAAO (10 µL) totaliza 100 µL de mistura reacional. Após 60 minutos a reação foi interrompida pela adição de 50 µL de ácido sulfúrico 2 mol/L e a absorvância foi determinada em 492 nm em

espectrofotômetro Tecan® Sunrise. A reação de clivagem do L-aminoácido pela LAAO é monitorada pela liberação de peróxido de hidrogênio no meio reacional (Figura 24).

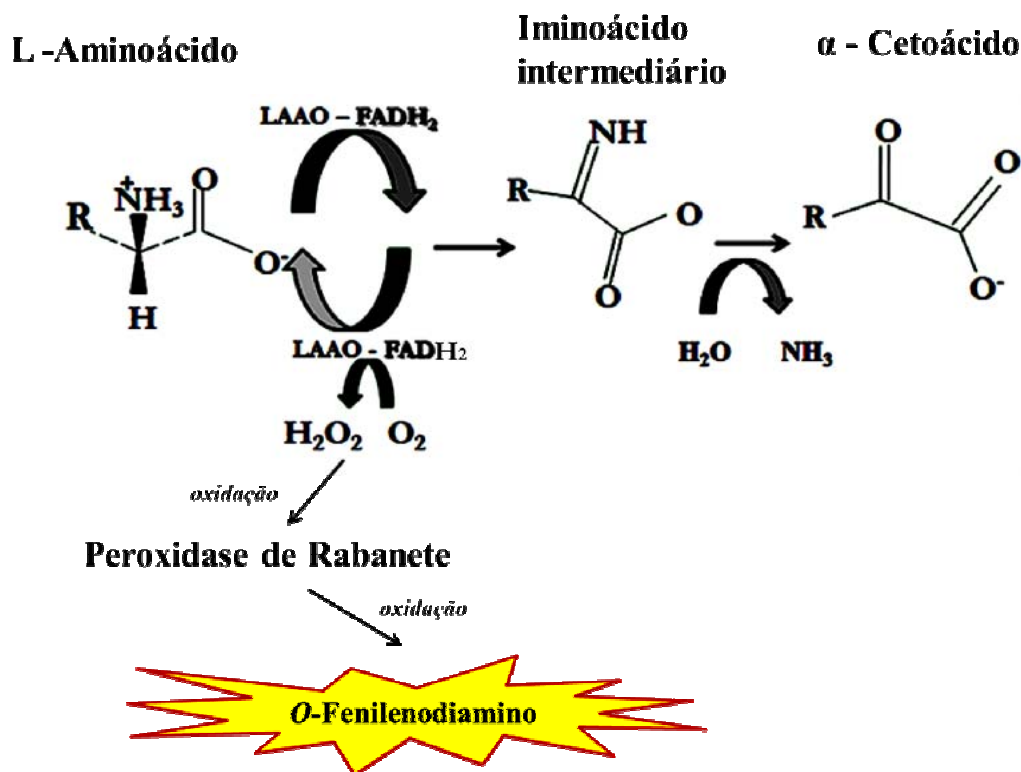


Figura 24. Formação do cátion cromóforo por meio da oxidação de *o*-fenilenodiamino. A atividade L-aminoácido oxidase é avaliada pela quantidade de peróxido de hidrogênio produzido pela reoxidação do cofator FAD da LAAO. O ensaio colorimétrico é quantificado pela formação de cor amarela devido à oxidação de *o*-fenilenodiamino pela peroxidase de rabanete.

Dessa forma, foi realizado um protocolo no qual diferentes quantidades de H₂O₂ foram adicionadas no meio reacional do ensaio de atividade L-aminoácido oxidase. Com os dados obtidos foi traçada uma curva de calibração e determinada a respectiva equação, que foi utilizada para quantificar a H₂O₂ produzida nos ensaios contendo LmLAAO. A padronização de H₂O₂ foi feita por análise titrimétrica (VOGEL, 1989).

3.4.1. Prospecção de L-aminoácido oxidase de *Lachesis muta* em frações obtidas por cromatografia

A atividade LAAO das frações obtidas de cada etapa cromatográfica dos dois protocolos de purificação foi realizada pela adição de 10 µL do eluído de cada tubo das cromatografias a 90 µL do meio reacional citado no *item 3.4*, e o ensaio foi realizado segundo

Kishimoto & Takahashi (2001), com modificações. Os resultados foram expressos em porcentagem de atividade L-aminoácido oxidase. A fração com maior atividade foi usada como parâmetro de 100% de atividade.

3.5. Estudos de cinética enzimática

Os ensaios de cinética enzimática foram feitos com LAAO purificada pelo Protocolo de Purificação 1.

3.5.1. Determinação da especificidade de L-aminoácido oxidase de *Lachesis muta* frente a diferentes aminoácidos.

Para a determinação da especificidade de LmLAAO frente aos diferentes aminoácidos foram preparadas soluções contendo 5 mmol/L de cada um dos aminoácidos: L-leucina, L-isoleucina, L-metionina, L-cisteína, L-valina, L-tirosina, L-triptofano, L-glutamina, L-treonina, L-serina, L-lisina, L-arginina, L-fenilalanina. Esses aminoácidos foram dissolvidos no meio reacional citado no *item 3.4* e o ensaio foi realizado segundo Kishimoto & Takahashi (2001), com modificações.

3.5.2. Determinação do melhor pH do meio reacional de Atividade L-aminoácido oxidase de *Lachesis muta* e influência do pH em sua atividade

Para analisar a variação de atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO quando presente em meios reacionais com diferentes pH, foram utilizadas quantidades fixas de substrato (L-Leucina 2,5 mM), de LmLAAO (50 ng por poço da microplaca), de peroxidase de rabanete (5 U) e de 2 mmol/L de *o*-fenilenodiamino em um volume final de 100 µL (KISHIMOTO e TAKAHASHI, 2001). O tempo reacional foi de 60 minutos a 37°C e terminada com a adição de 50 µL de H₂SO₄ a 2 M e monitorado a 492 nm. Os ensaios foram feitos em triplicata e o gráfico foi traçado com a média dos valores encontrados ± desvio padrão. O ensaio em microplaca para a determinação de atividade L-aminácido oxidase depende, sobretudo da perfeita atividade enzimática da peroxidase de rabanete, a qual tem uma faixa de pH ótimo para sua atividade variando entre 6,0 e 6,5. Dessa forma, para não alterar os resultados por ineficiência da peroxidase de rabanete, a faixa testada de pH do meio reacional ficou entre 6 e 9. Os tampões utilizados foram MES (pH 6 e pH 6,5), Tris HCl (pH

7 e pH 7,5, 8,0, 8,5 e 9,0) todos a 50 mmol/L. Também foram feitos ensaios onde só a LmLAAO foi incubada em diferentes pHs por 30 minutos a 37°C antes de se colocar no meio reacional contendo peroxidase de rabanete e ortofenilenodiamino. Os pHs testados e os tampões utilizados foram acetato de sódio para pH 4, Tris HCl para pH 7 e pH 10. A LmLAAO purificada foi diluída nesses tampões com diferentes pHs de forma que sua quantidade final no poço da microplaca fosse de 50 ng.

3.5.3. Determinação da atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO depois de incubada em diferentes temperaturas

Para analisar a atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO depois de incubada em diferentes temperaturas, incubou-se a enzima isolada a -70°C, -20°C, 0°C, 4°C, 37°C e 100°C (a LmLAAO permaneceu em água nas diferentes temperaturas), por 30 minutos. Como o ensaio para a determinação de atividade L-aminoácido oxidase depende de peroxidase para ocorrer, o meio reacional não foi incubado em diferentes temperaturas para que a peroxidase não fosse desnaturada, alterando assim os resultados. Depois de incubada em diferentes temperaturas a LmLAAO foi adicionada ao meio reacional com quantidades fixas de substrato (L-Leucina 2,5 mmol/L), de LmLAAO (50 nmol por poço da microplaca), de peroxidase de rabanete (5 U), e de 2 mmol/L de *o*-fenilenodiamino em um volume final de 100 µL (KISHIMOTO e TAKAHASHI, 2001). O tempo reacional foi de 60 minutos a 37°C e terminada com a adição de 50 µL de H₂SO₄ a 2 M e monitorado a 492 nm.

3.5.4. Determinação de K_m e V_{max} da LmLAAO

Para a determinação dos parâmetros cinéticos para LmLAAO foi utilizado o método descrito por Kishimoto e Takahashi (2001), com modificações. O meio reacional foi composto de Tris HCl 50 mmol/L, pH 8,0, no qual foi variada a concentração do substrato L-Leucina (0,3 a 2,3 µmol/L). A concentração de LmLAAO foi mantida em 4,4 nmol/L. A reação foi mantida a 37°C e terminadas após 1 hora, com a adição de 50 µL de H₂SO₄ (2 mol/L). A absorvância foi monitorada em 492 nm usando como referência 630 nm.

3.6. Determinação da massa molar da LAAO de *Lachesis muta*

3.6.1 Determinação do massa molar por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

As frações obtidas em cada etapa de purificação cromatográfica da peçonha de *L.muta* foram avaliadas por meio de eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS (SDS-PAGE). O gel de resolução foi preparado com bis acrilamida / acrilamida a 10% (m/v), tampão Tris-HCl 1 M e SDS presente no gel na concentração final de 0,1%, segundo método descrito por LAEMMLI (1970), com modificações. O gel de concentração a 5% em acrilamida foi preparado em tampão Tris-HCl 0,5 M (concentração de 0,125 M no gel), pH 6,8 e SDS (concentração final de 0,1% no gel).

Foram aplicadas no gel 10 μ L de amostra (10 - 15 μ g de proteína). Os géis foram corados por 2 horas com Coomassie Blue G250 0,1% (m/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (40:50:10 v/v) e descorado com ácido acético 10% por 24 horas. Após descorar, os géis foram colocados entre folhas de papel celofane e escaneados por impressora multifuncional HP Dekjet F300 series. A distância de migração de cada padrão foi determinada em centímetros e a determinação de massa molar foi feita relacionando-se a mobilidade eletroforética relativa com o logaritmo do peso molecular do padrão. Os padrões de alto peso molar (HMWS) utilizados foram: Miosina 212 kDa, α 2Macroglobulina 170 kDa, β Galactosidase 116 kDa, Transferrina 76 kDa, Subunidade da α 2-macroglobina 70 kDa e Desidrogenase glutâmica 53kDa; padrão de baixo peso molar (LMWS), Soroalbumina bovina, 66 kDa, Ovalbumina 45 kDa, Gliceraldeído 3 fosfato desidrogenase de músculo de coelho 36 kDa, Anidrase carbônica de eritrócito bovino, 29 kDa, Tripsinogênio pâncreas bovino, 24 kDa, Inibidor de tripsina de soja, 20 kDa, Lactalbumina leite bovino 14,2 kDa, Aprotinina pulmão bovino 6,5 kDa.

Além do ensaio para determinação da massa molar na ausência de agente redutor, foi também realizada uma eletroforese com amostras submetidas a aquecimento e na presença de β -mercaptoetanol.

3.6.2. Determinação da massa molar por espectrometria de massa

A determinação da massa molar relativa foi conseguida em colaboração com o Dr. Bruno Lomonte, pesquisador do Instituto Clodomiro Picado, Universidade da Costa Rica.

Depois de purificada, LmLAAO foi submetida a uma eletroforese em gel de poliacrilamida (10% em acrilamida) em condições redutoras e não redutoras. As bandas obtidas foram excisadas e submetidas à uma redução em gel por ditioneitol, alquilação com iodoacetamida e digestão com tripsina em um digestor automático (ProGest, Digilab), de acordo com os protocolos do fabricante. Os peptídeos resultantes foram analisados por MALDI-TOF-TOF em espectômetro de massas 4800-Plus da Applied Biosystems. As amostras foram preparadas com 0,5 µL de ácido α -ciano-4-hidroxicinâmico e 0,5 µL de solução de LmLAAO, secadas em aparato Opti-TOF 384 (ABSciex), e analisadas em modo refletor. O espectro foi adquirido usando um laser com intensidade de 3000 e 1625 *shots* por espectro, depois de calibração com padrões CalMix-5 (ABSciex). Mais de dez precursores de picos de cada espectro de massas foram selecionados por dissociação induzida por colisão a 2 KV em modo positivo (500 *shots*/espectro, intensidade do laser 3000). O espectro resultante foi analisado por ProteinPilot v.4.0.8 (ABSciex) o qual identifica proteínas com nível de confiança de 99%.

Para a determinação da massa de proteína, misturas de 0,5 µL ácido sinapínico e 0,5 µL da solução de LmLAAO foram aplicadas como descrito acima, secadas e analisadas em modo linear positivo no instrumento AB 4800-Plus. O espectro foi adquirido em um intervalo da relação m/z de 20.000 a 150.000 com intensidade do laser de 4200 a 500 *shots* por espectro.

3.7. Sequenciamento amino-terminal

A determinação dos 40 primeiros resíduos a partir da extremidade N-terminal da LmLAAO foi realizada em seqüenciador automático de proteínas Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). A seqüência foi obtida através do método de degradação de Edman (EDMAN e BEGG, 1967), a qual consiste em três etapas: acoplamento, clivagem e conversão (Figura 25). Na etapa de acoplamento, uma molécula de fenilisotiocianato (PITC) liga-se ao nitrogênio N-terminal do peptídeo, formando o PITC-peptídeo. Logo após, em meio ácido, o par de elétrons do enxofre proveniente do fenilisotiocianato ataca o primeiro carbono da ligação amídica do peptídeo, formando um composto cíclico tiazolínico, o ATZ-aminoácido que se desliga do peptídeo restante. O ATZ-aminoácido em meio ácido sofre um rearranjo e forma assim, o PTH-aminoácido o qual é então identificado em cromatografia de fase reversa. A quantificação e identificação das amostras são realizadas através da comparação com padrão de 25 pmol analisado no início de cada sequenciamento.

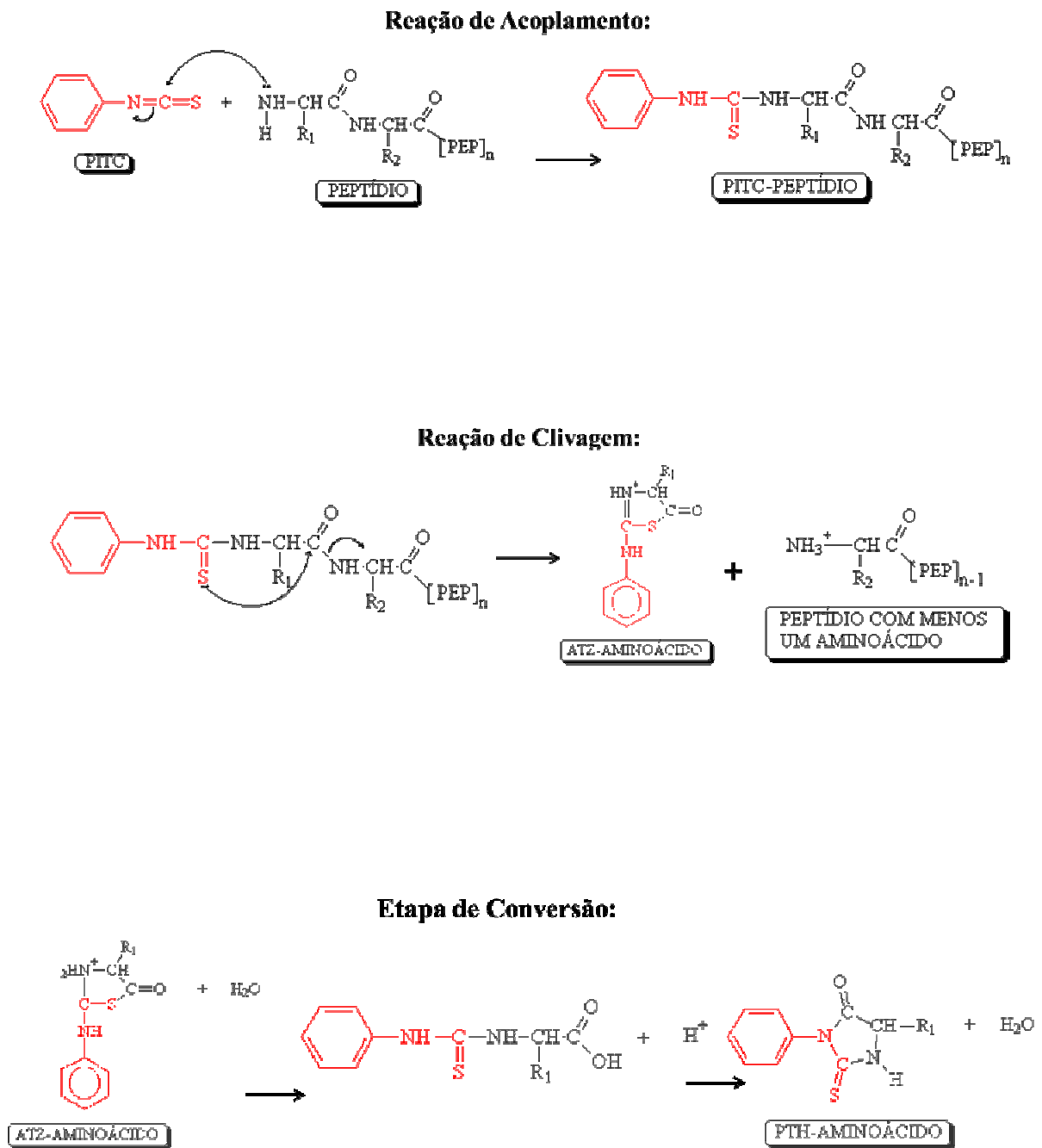


Figura 25. Sequenciamento de aminoácidos por Degradação de Edman. Disponível em: <http://vsites.unb.br/cbsp/edman.htm> Acesso: 29 nov. 2009.

3.8. Clonagem e sequenciamento de cDNA da LmLAAO

O sequenciamento do cDNA da LmLAAO foi realizado pelos pesquisadores Paulo Lee Ho e Inácio L. M. Junqueira de Azevedo do Instituto Butantan.

Uma serpente *Lachesis muta* foi mantida por anos no serpentário da Fundação Ezequiel Dias (Belo Horizonte, Brasil) para a produção de soro antiofídico. O par de glândulas de peçonha foi obtido alguns momentos após a morte natural da serpente e o RNA total foi isolado seguindo o procedimento descrito por Chirgwin *et al.* (1979). A purificação do RNA foi feita em uma coluna de oligo-dT cellulose (Amersham Biosciences) e sua integridade foi avaliada *in vitro* através de lisado de reticulócitos de coelho (PELLHAM e JACKSON 1976). O cDNA foi sintetizado a partir de 5 mg de mRNA usando *System for cDNA Synthesis and Cloning* (Invitrogen), clonado direcionalmente em plasmídeo pGEM11Zf+(Promega) e transformado em *E. coli* DH5 α , como descrito em Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002). Para sequenciamento de DNA em larga escala (geração de ESTs - Expressed Sequence Tags), clones randômicos foram cultivados por 22 horas em meio contendo antibiótico e o plasmídeo de DNA foi isolado usando lise alcalina, como descrito por Junqueira-de-Azevedo e Ho (2002). Assim, o DNA foi sequenciado em sequenciador ABI 3100, usando kit BigDye2 (Applied Biosystems) e padrão M13 para primer. As ESTs geradas foram comparadas com os bancos de dados, como o GenBank, via ferramenta Blast (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>), levando à identificação dos transcritos. Dentre os transcritos identificados, 20 ESTs apresentaram alta similaridade com LAAOs de outros viperídeos. A seqüência completa do cDNA da LAAO de *Lachesis muta* foi resolvida pela sobreposição dessas 20 ESTs e confirmada manualmente, sendo o cDNA completo nomeado como LMUT0069C.

3.9. Análise *in silico*

Os parâmetros físico-químicos teóricos foram preditos e analisados pelo programa ProtParam (disponível em www.expasy.org). A predição da estrutura tridimensional de LmLAAO, foi construída com ajuda da Profa Dra. Maria Cristina Nonato do Laboratório de Cristalografia de um modelo baseado em homologia sequencial. Para isso, inicialmente buscou-se homólogos protéicos usando-se os algoritmos BLAST (disponível em <http://blast.ncbi.nlm.nih.gov/Blast.cgi>) e Protein Data Bank (disponível em www.rcsb.org). A estrutura cristalográfica de LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (PDB:1REO, ZHANG *et al.*,

2004) foi usada como molde para a modelagem molecular. Baseado em alinhamento feito pelo programa MULTALIN (CORPET, 1988), as substituições foram incluídas manualmente no modelo, usando o programa COOT (EMSLEY e COWTAN, 2004). O refinamento estrutural foi feito usando dinâmica molecular com minimização de energia em programa CNS (BRUNGER et al., 1998) e a estereoquímica do modelo predito foi conferida pelo programa PROCHECK (LASKOWSKI et al., 1993).

Os sítios de N-glicosilação foram determinados pela ferramenta NetNGlyc, (disponível em <http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>). Os estudos de modelagem molecular foram realizados pela Dra. Maria Cristina Nonato da FCFRP-USP e pela autora desta tese.

Para a construção do cladograma com a sequência de aminoácidos de LmLAAO foi usado o software CLUSTAL X 2.1 e o alinhamento foi feito no modo *multiple alignment mode and performing a complete alignment* e só foram usadas sequências de aminoácidos para serpentes. Para criação do cladograma foi empregado o software TreeViewX ver 0.5.0 e para a conformação do cladograma utilizou-se o algoritmo de agrupamento NJ, considerando-se uma distância mínima de 100 e máxima de 1000.

3.10. Determinação do ponto isoelétrico

O ponto isoelétrico da LmLAAO foi determinado segundo método descrito por VESTERBERG (1972) com modificações. O gel foi preparado com 5% em acrilamida, 9,8% (v/v) em glicerol, 0,4% (v/v) em TEMED, 0,05% (p/v) de persulfato de amônio e anfólitos pH 3,0 a 10.

Depois de polimerizado, o gel foi colocado sobre uma placa refrigerada a 4°C. Os eletrodos foram posicionados nas extremidades do gel e, para evitar contato direto dos eletrodos com o gel, foram colocados *strips* embebidos com solução de NaOH 1M para o cátodo e H₃PO₄ 1M para o ânodo. Para realizar a pré-focalização, a fonte de alta voltagem foi ajustada para valores de 1500 V, 30 mA e 10 W. A pré focalização foi realizada em 30 minutos com condições finais de 619 V, 16,2 mA e 10 W. As amostras líquidas (10 µL) foram colocadas sobre o gel, a fonte de alta voltagem foi novamente ajustada para valores de 2000 V, 20 mA e 10 W. Para a detecção e determinação do gradiente de pH, após a focalização foram retiradas tiras com dimensões de 1,0 x 2,0 cm das duas laterais do gel sendo que estes pedaços foram cortados intercaladamente, para obtenção de valores médios de pH a cada 0,5 cm. Os pedaços do gel foram colocados em tubos contendo 500 µL de água deionizada e

deixados em repouso por 12 horas. Após o repouso, foi medido em cada tubo o pH correspondente à faixa do gel. O gel restante contendo a amostra foi colocado durante 15 minutos em uma solução de ácido tricloroacético a 10% (m/v) e ácido sulfosalicílico a 2% (m/v). Depois de lavado com água destilada, o gel foi corado com uma solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução de água/metanol 1:1 (v/v). Para descorar o gel, usou-se uma solução metanol/ácido acético/água, 3:1:9 (v/v).

3.11. Atividades Farmacológicas

3.11.1. Ensaios biológicos *in vivo*

As atividades farmacológicas realizadas no *item 3.11.1* foram realizadas sob a orientação do Dr. José Maria Gutiérrez do Instituto Clodomiro Picado, Costa Rica.

Os animais foram tratados de acordo com as recomendações éticas do *International Guiding Principles for Biomedical Research Involving Animals* do *Council of International Organizations of Medical Sciences* (CIOMS). O uso dos animais foi aprovado pelo Comitê Institucional para o Cuidado e Uso de Animais de Laboratório (CICUA) da Universidade de Costa Rica (CICUA -012-08).

Atividade Hemorrágica

A atividade hemorrágica foi determinada pela injeção intradermal de 50 µg de LmLAAO dissolvida 50 µL de solução de PBS na região abdominal de 03 camundongos da linhagem CD-1 (18-22g). Após 3 horas, os animais foram sacrificados e a pele da região abdominal foi retirada para observação de formação de halo hemorrágico (GUTIÉRREZ et al., 1985).

Indução de Edema

Um grupo de 06 camundongos CD-1 (18-22g) foram injetados subcutaneamente na pata traseira direita com uma solução de 10 µg de LmLAAO dissolvidos em 50 µL de PBS (0,12 M de NaCl, 0,04 M de fosfato de sódio, pH 7,2). Na pata traseira esquerda do mesmo animal foi injetado subcutaneamente 50 µL de PBS, e usado como controle. Em diferentes intervalos de tempo (15 minutos, 1, 3 e 24 horas), foi medida a espessura das patas dos camundongos com paquímetro de relógio (LOMONTE et al., 1993). A formação de edema foi expressa em média de edema induzido (mm) ± desvio padrão.

Atividade miotóxica

Teste creatina-cinase (CK)

Um grupo de 05 camundongos da linhagem CD-1 (18-22 g) foi injetado na região do quadríceps femoral direito com solução contendo 100 µg de LmLAAO dissolvida em PBS. Outro grupo de 05 camundongos da linhagem CD-1 (18-22g) foi injetado também no quadríceps femoral direito com PBS e usados como controle. Depois de 3 horas o sangue foi coletado da cauda dos animais com auxílio de tubos capilares heparinizados e centrifugados a 4000 xg por 10 minutos para a separação do plasma. A atividade creatina-quinase (CK) foi determinada por ensaio colorimétrico seguindo-se o protocolo de um de um kit comercial (Sigma). A atividade CK foi determinada usando-se 4 µL do plasma dos camundongos, incubado com 500 µL a 30°C por 2 minutos do reagente, de acordo com o protocolo cinético CK-UV. A atividade foi expressa em U/L a 30°C, sendo uma unidade a produção de 1 µmol de NADH/minuto.

Estudos histológicos

Após a colheita de sangue da cauda dos camundongos CD-1 injetados em quadríceps femoral para a determinação da atividade miotóxica, procedeu-se o sacrifício dos mesmos por deslocamento cervical. Os músculos injetados tanto com LmLAAO como com PBS foram dissecados e as amostras foram processadas para observação histológica, de acordo com Moreira et al. (1994).

Toxicidade sistêmica

A toxicidade sistêmica foi avaliada em um grupo de 06 camundongos CD-1 (18-22 g) pela injeção intravenosa de 100 µg de LmLAAO. Um grupo de 06 camundongos CD-1 (18-22 g) injetados com PBS foi usado como controle. Observou-se o comportamento do animal nas 3 primeiras horas após a injeção. Após 24 horas da injeção, os animais foram sacrificados por deslocamento cervical e os tecidos de coração, pulmão e rins foram retirados, dissecados e as amostras foram processadas para observação histológica, sendo incluídas em parafina, cortadas com 4 µm de espessura e corados com Hematoxilina y Eosina.

3.11.2. Ensaio biológicos *in vitro*

Atividade toxicológica de LmLAAO sobre a linhagem de carcinoma mamário (MCF-7) e carcinoma de estômago (AGS).

A susceptibilidade à LmLAAO foi testada em duas linhagens de células tumorais. A linhagem celular **MCF-7** é proveniente de câncer de mama e foi originalmente isolada em 1970. Hoje é amplamente utilizada como modelo de carcinoma de mama (MCF -7, 2011). A linhagem **AGS** é derivada de fragmentos de tumor retirados de um paciente caucasiano que não recebeu tratamento anti-câncer (BARRANCO et al., 1983).

As células foram mantidas em meio essencial Dulbecco suplementado com 10% soro bovino fetal, 2 mmol/L de glutamina, 100 IU/ml de penicilina e anfotericina B a 37°C em uma estufa umidificada com atmosfera de 7% em CO₂. Para os experimentos, as células foram cultivadas em placa de 96 poços (15000 células / poço) e deixadas *overnight* para a confluência.

Diferentes concentrações de LmLAAO (75; 37,5; 18,75; 9,37; 4,68; 2,34 e 1,17 µg/mL) foram adicionadas à células aderidas em microplaca de 96 poços em um volume final de 100 µL e incubadas por 24 horas. Controles foram feitos com catalase a 0,1 mg/mL.

A avaliação da atividade LmLAAO sobre as células foi realizada pela técnica colorimétrica de oxidação de MTT (MOSMANN, 1983). Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de lise celular (%LC) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%LC = [(AE-AEB)/(AC-ACB)] \times 100 \text{ onde:}$$

AE = absorvância dos poços tratados com LmLAAO;

AEB= absorvância dos poços contendo meio e substância (catalase);

AC=absorvância dos poços contendo controle negativo;

ACB= absorvância dos poços contendo meio de cultura.

A dose inibitória 50% (IC₅₀), média e desvio padrão foram calculados com auxílio do software Graphpad Prism 5,0.

Atividade toxicológica de LmLAAO sobre a forma promastigota de *Leishmania sp.*

A forma promastigota (*Leishmania braziliensis*) do parasita foi cultivada em meio 199¹ suplementado com 10% de soro bovino fetal, penicilina e estreptomicina e mantidos a 22°C. Os parasitos em fase estacionária foram depositados em microplacas de 96 poços na concentração de 1×10^6 parasitos/mL, onde as várias concentrações de LmLAAO (0,5, 2, 8 e 32 µg/mL) foram adicionadas para o período de incubação de 24 horas. Controles foram feitos com água, com meio 199, com catalase (0,1 mg/mL) e com a cepa de parasitos. Após 24 horas, a avaliação da atividade foi realizada pela técnica colorimétrica de oxidação de MTT como descrita por Muelas-Serrano et al. (2000) e Mosmann (1983).

Os resultados foram expressos em porcentagem de lise celular (%LC) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%LC = [(AE-AEB)/(AC-ACB)] \times 100$$

onde:

AE = absorvância dos poços tratados com LmLAAO;

AEB = absorvância dos poços contendo meio e substância;

AC = absorvância dos poços contendo controle negativo;

ACB = absorvância dos poços contendo meio de cultura.

Os ensaios foram realizados em triplicata para cada concentração de LmLAAO e controles. A dose inibitoria 50% (IC50), média e desvio padrao foram calculados com auxílio do software Graphpad Prism 5,0.

Atividade toxicológica de LmLAAO sobre a forma tripomastigota de *T. cruzi*

A forma tripomastigota da cepa CL Brener 5² foi cultivada em meio RPMI 1640³ e submetidas à contagem em hemocítômetro de Neubauer, para ajustar a quantidade de parasitas utilizados nos procedimentos experimentais. Os ensaios foram realizados de acordo com a metodologia descrita por Vega et al. (2005), na qual as formas do parasito foram incubadas em microplaca de 96 poços com diferentes concentrações de LmLAAO (0,5, 2, 8,

¹ 199 é um meio de cultura caracterizado por ser pobre em ácido fólico, usado principalmente para cultura de células não transformadas.

² A cepa CL Brener de *Trypanosoma cruzi*, contém o gene da β-galactosidase o qual confere alta sensibilidade aos ensaios farmacológicos (BUCKNER et al., 1996)

³ Em sua composição, o meio de cultivo celular RPMI (Instituto Roswell Park Memorial) 1640 não tem timidina, sendo utilizado para a obtenção de sincronização da divisão celular. Disponível em < <http://www.cultilab.com.br> > data de acesso: 29 de julho de 2011.

32µg/mL), a 4°C, durante 24 horas. Após este período 50 µl da solução de CPRG (*chlorophenol red β -D-galactopyranoside*, 400µM em 0.3% Triton X-100, pH 7.4) foram adicionados e a microplaca incubada a 37°C por 6 h. Controles foram feitos com água, com meio RPMI 1640, com catalase (0,1 mg/mL) e com a cepa de parasitos. A avaliação da atividade LmLAAO sobre os parasitos foi realizada pela técnica colorimétrica de oxidação de MTT, como descrita por Muelas-Serrano et al. (2000) e Mosmann (1983). Os ensaios foram realizados em triplicata e expressos em porcentagem de lise celular (%LC) de acordo com a seguinte fórmula:

$$\%LC = [(AE-AEB)/(AC-ACB)] \times 100 \text{ onde:}$$

AE = absorvância dos poços tratados com LmLAAO;

AEB= absorvância dos poços contendo meio e substancia (catalase);

AC=absorvância dos poços contendo controle negativo;

ACB= absorvância dos poços contendo meio de cultura.

A dose inibitória 50% (IC50), média e desvio padrão foram calculados com auxilio do software Graphpad Prism 5,0.

3.12. Análises Estatísticas

Todos os testes estatísticos foram realizados utilizando os softwares SSPS 17.0 para Windows e todos os valores de $P \leq 0,05$ foram considerados significativos.

4. Resultados e Discussão

4.1. Fracionamento da peçonha de *Lachesis muta* para obtenção da LmLAAO

4.1.1. Protocolo de purificação 1

Gel Filtração em Sephacryl S-100®

O perfil cromatográfico obtido a partir da gel filtração em *Sephacryl S-100®* (coluna pré-empacotada - Hiprep 16/60, GE Healthcare) em sistema Äkta UPC10 (GE), como descrita no item 3.3.1., apresentou dez frações denominadas SLM₁, SLM₂, SLM₃, SLM₄, SLM₅, SLM₆ e SLM₇, SLM₈, SLM₉, SLM₁₀ (Figura 26). A atividade L-aminoácido oxidase foi determinada para os tubos de 1 a 95 e a fração denominada SLM₁ (Figura 26) apresentou maior atividade enzimática. Todo o processo cromatográfico foi monitorado automaticamente a 280 nm.

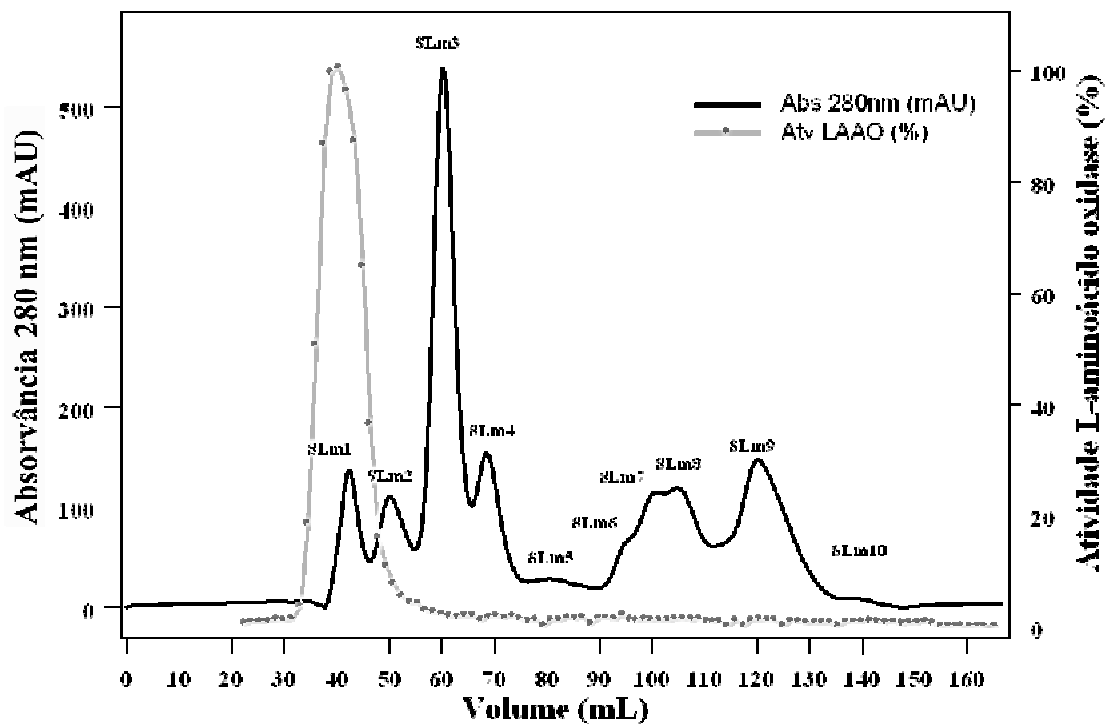


Figura 26. Perfil cromatográfico de eluição da peçonha bruta de *Lachesis muta* em Sephacryl S100®. A peçonha de *L. muta* (20 mg) foi dissolvida no tampão de eluição, aplicada à coluna (16 mm x 60 cm) previamente equilibrada com TrisHCl 20 mM, pH7,2 a 25°C a uma vazão de 0,5 mL/minuto, e coletou-se 1,5 mL/tubo.

Sephacryl® é uma resina composta de ligações cruzadas entre alil-dextrana e N,N'-bisacrilamida (Figura 16) e formam uma matriz hidrofílica, que promove a separação de uma mistura de substâncias por sua massa molar. O tampão de eluição escolhido para essa gel

filtração é composto de Tris HCl 20 mM o qual mantém o pH constante em 7,2. Esse valor de pH é próximo ao valor do pH da peçonha recém extraída de *Lachesis muta* (pH 7,0) e evita condições extremas de pH, as quais causam desnaturação de enzimas. Além do Tris HCl 20 mM, o tampão de eluição também possui NaCl 0,15M, o qual fornece uma força iônica suficiente para evitar interações dependentes de pH com a resina.

Embora a gel filtração na primeira etapa de fracionamento seja adequada por apresentar condições suaves de corrida, a resina Sephacryl S100® não é a opção mais adequada. Segundo o manual do fabricante (GE LIFE SCIENCES,2011)¹, a linearidade da faixa de separação está entre 1000 e 100000 Da. Como este fracionamento foi parte dos estudos preliminares de purificação de LmLAAO, e ainda não se sabia com certeza o valor da massa molecular da LmLAAO, foi possível com os estudos posteriores alterar o perfil de purificação da LmLAAO. Contudo, como se observa na Figura 26, a LmLAAO foi eluída no primeiro pico de purificação e com sua atividade LAAO mantida.

Uma alíquota da fração SLM₁ (Figura 26) a qual apresenta maior atividade L-aminoácido oxidase, foi retirada para visualização da migração eletroforética em condições desnaturantes (SDS-PAGE) com e sem agente redutor (presença ou ausência de β-mercaptoetanol) no tampão de preparo da amostra (Figura 27).

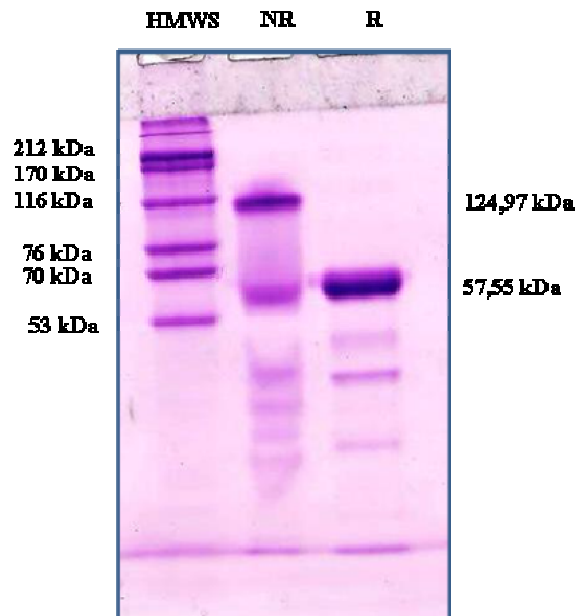


Figura 27. SDS-PAGE (10% de poliacrilamida) da Fração SLM₁. Amostra proveniente da cromatografia em Sephacryl S100®. HMWS - Padrão de massa molar: Miosina 212 kDa, α_2 -macroglobina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, Transferrina 76 kDa, Subunidade da α_2 -macroglobina 70kDa, Glutamato desidrogenase 53 kDa. NR-Amostra em condições não redutoras, R- Amostra em condições redutoras.

¹ Disponível em www.gelifesciences.com. Acesso em 20 jul. 2011.

Para a determinação da massa molar das proteínas foi feito um plote do logaritmo da massa molar dos padrões usados na eletroforese versus a distância de migração em centímetros das proteínas pelo gel de eletroforese (Figura 28). Com a equação de reta obtida, determinou-se a massa molar das proteínas presentes no gel da Figura 24.

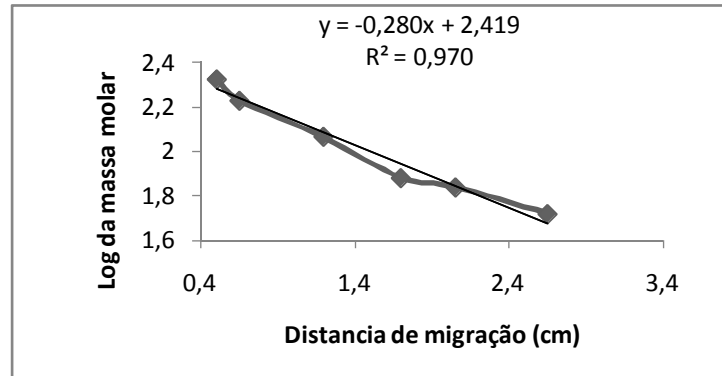


Figura 28. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em Sephacryl S100®. A equação da reta foi determinada pelo plote dos dados de log da massa molar do padrão (HMWS) versus a distância de migração (cm) no gel e foi usada para determinar a massa molar das proteínas de interesse.

Para a alíquota da fração SLM1 sem agente redutor, observa-se a presença de duas bandas principais, uma com 124,9 kDa e uma com 57,5 kDa. Para a amostra de SLM1 com agente redutor, notou-se a presença de uma banda principal com 57,5 kDa. Geralmente, as LAAOs purificadas de peçonha de serpente apresentam de 110 a 150 kDa, quando a massa molecular é determinada por gel filtração ou em condições não redutoras. Porém, apresentam de 50 a 70 kDa quando analisadas em condições redutoras, indicando que a maioria das LAAOs de serpentes podem apresentar-se como homodímeros associados não covalentemente (DU e CLEMETSON, 2002). A LmLAAO mostrou este comportamento, como pode ser observado no gel da Figura 24.

Em SDS-PAGE realizado com a SLM1 foram observadas a presença da LmLAAO, além de outras proteínas com massa molecular menor (Figura 27), indicando a necessidade de passos adicionais de purificação. O próximo passo escolhido de purificação foi uma cromatografia de troca iônica.

Cromatografia de Troca Iônica em coluna Mono Q

Como não foi possível a total purificação da LmLAAO por gel filtração, a fração SLM1 (Figura 26) foi submetida a uma nova etapa cromatográfica e optou-se por uma resina

de troca iônica forte (Mono Q®, Tricorn; GE Healthcare). O perfil cromatográfico apresentou três frações denominadas MQLm1, MQLm2 e MQLm3 (Figura 29).

A avaliação da atividade LAAO foi realizada tubo a tubo nesta estapa cromatográfica e as maiores atividades foram detectadas nos tubos 17, 18 e 19 (equivalente a aproximadamente 16 mL de eluição) na fração denominada MQLm2 (Figura 29). Esta cromatografia foi realizada a 25°C, em sistema Äkta UPC10 (GE) e foram coletadas frações de 1,0 mL. A absorvância foi determinada automaticamente em 280 nm.

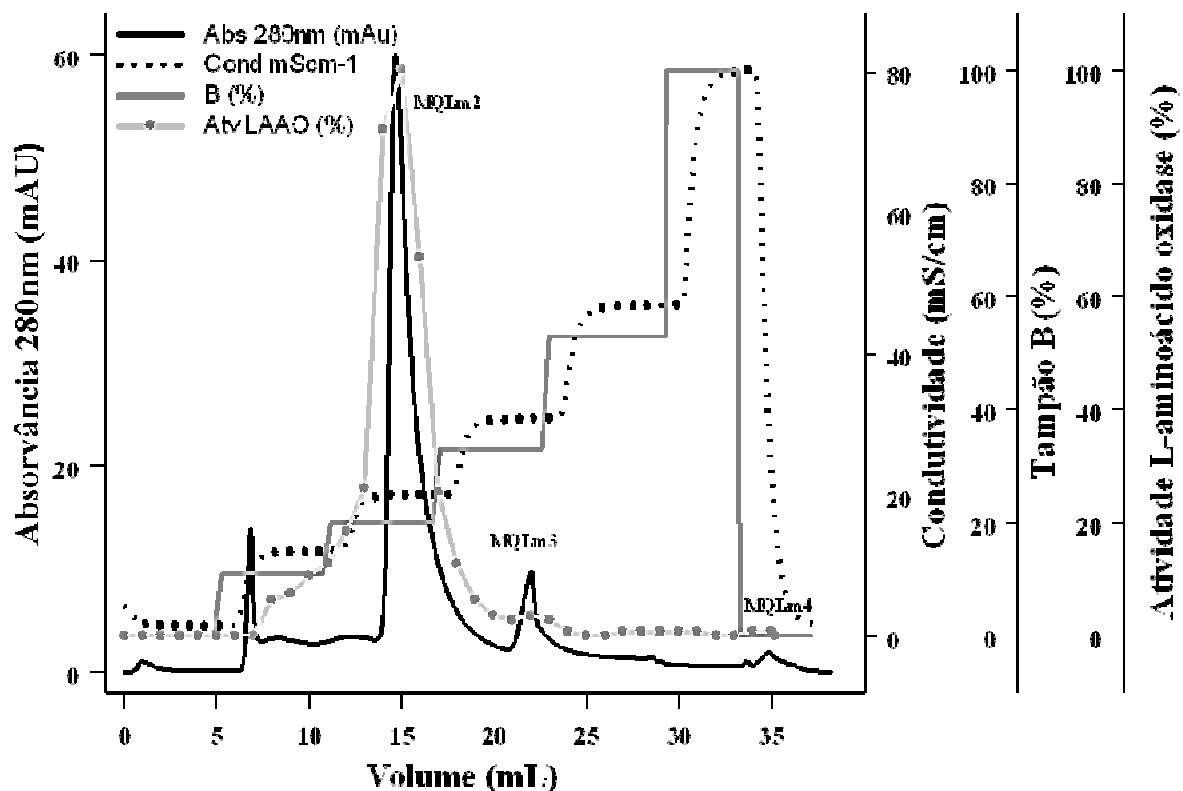


Figura 29. Perfil de eluição em Mono Q® da fração SLm1 com atividade L-aminoácido oxidase proveniente *Sephacryl S100*® em resina Mono Q®, com gradiente de concentração de cloreto de sódio 1M em tampão Tris HCl 0,02 Mol/L, pH 7,2. A cromatografia foi monitorada em 280 nm, 25°C com vazão de 1 mL/min e coletou-se 1 mL por tubo

A resina Mono Q possui matriz de poliestireno e, como ligante intercruzado, o divinilbenzeno. O grupo trocador iônico é um amônio quaternário ($-O-CH_2-N^+(CH_3)$). Para esta cromatografia, a fração com alta atividade L-aminoácido oxidase (SLm1 – Figura 26) foi purificada utilizando tampão Tris-HCl e a eluição foi realizada com gradiente de NaCl 1 M. Esse tampão manteve o valor de pH constante em 7,2, valor escolhido por estar cerca de duas unidades acima do valor do ponto isoeletrico de LmLAAO, o qual foi determinado em experimento prévio (dados não mostrados). A presença de resíduos com carga negativa em

LmLAAO quando no pH do eluente (7,2), auxiliaram na interação da enzima com a resina de troca iônica forte, resultando em uma perfeita purificação, como demonstrado em SDS-PAGE realizado em gel de poliacrilamida a 10% (Figura 30).

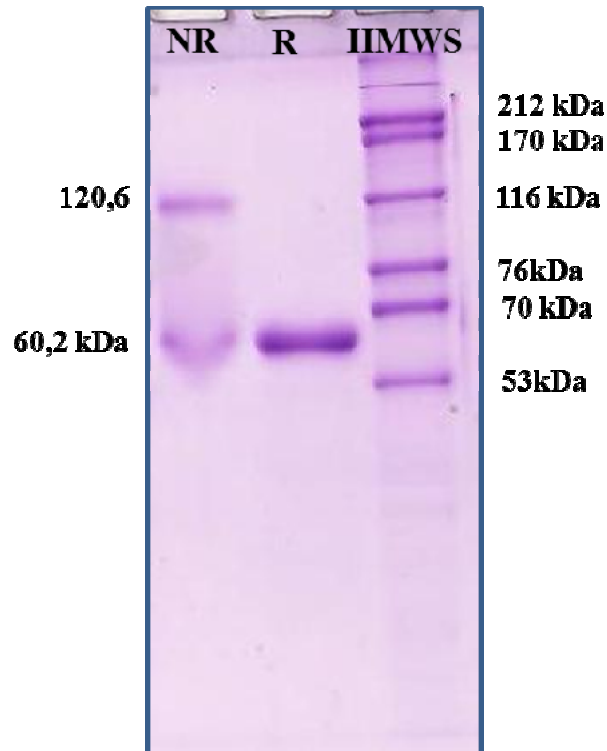


Figura 30. SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da Fração MQLm2. Amostra proveniente da cromatografia em Mono Q® (figura 26). HMWS - Padrão de massa molar: Miosina 212 kDa, α_2 -macroglobina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, Transferrina 76 kDa, Subunidade da α_2 -macroglobina 70 kDa, Glutamato desidrogenase 53 kDa. NR-Amostra em condições não redutoras, R- Amostra em condições redutoras.

O perfil eletroforético proveniente da fração MQLm2 (Figura 29) mostra duas bandas com massa molar de 120,6 kDa e 60,2 kDa quando não há a presença de beta mercaptoetanol no tampão de preparo da amostra para eletroforese, e apenas uma banda bem definida com 60,2 kDa quando há a presença de beta mercaptoetanol. Considerando os erros inerentes de determinação de massa molecular por migração eletroforética, pode-se concluir que as bandas com 124,9 kDa e uma com 57,5 kDa encontradas em SDS-PAGE feita com amostras originadas da SLM1 correspondem à LmLAAO, e que o segundo passo de purificação por troca iônica em resina Mono Q® foi eficiente. Na Figura 31 está representado o plote do logaritmo da massa molar dos padrões usados na eletroforese versus a distância de migração em centímetros das proteínas obtidas neste último passo de purificação.

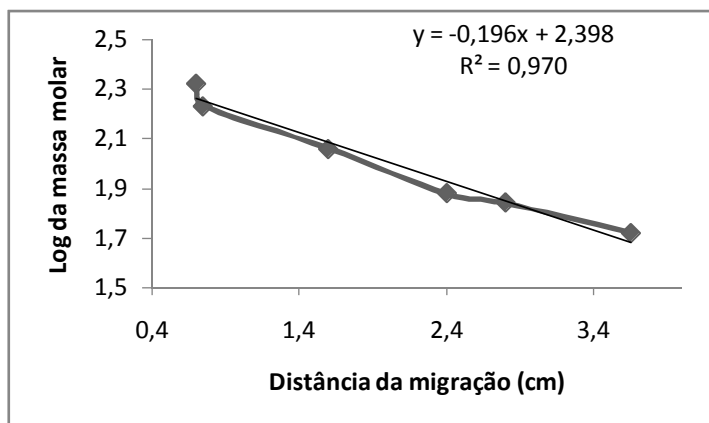


Figura 31. Curva de calibração para determinação da massa molecular de proteínas purificadas em Mono Q®. A equação da reta foi determinada pelo plote dos dados de log da massa molar do padrão (HMWS) *versus* a distância de migração (cm) no gel e foi usada para determinar a massa molecular das proteínas de interesse.

Cromatografia de Fase reversa em coluna C4

A etapa posterior de purificação consistiu de uma cromatografia de fase reversa em coluna C4 *Shodex Asahipack C4P-50 4E*. O cromatograma obtido está representado na Figura 32. Esta etapa cromatográfica foi realizada apenas para assegurar a real pureza da LmLAAO, a ser submetida ao seqüenciamento N-terminal. Foi determinada a atividade enzimática das frações obtidas nesta etapa cromatográfica e infelizmente a LmLAAO não resistiu à mistura de ácido trifluoracético e acetonitrila, usada como fase móvel, e perdeu a atividade enzimática. Provavelmente, além da desnaturação por modificações estruturais devido a interações entre os aminoácidos hidrofóbicos da LmLAAO e a fase móvel utilizada, ocorreu também a dissociação do cofator FAD, levando à perda da atividade L-aminácido oxidase da fração C1 eluída (Figura 32).

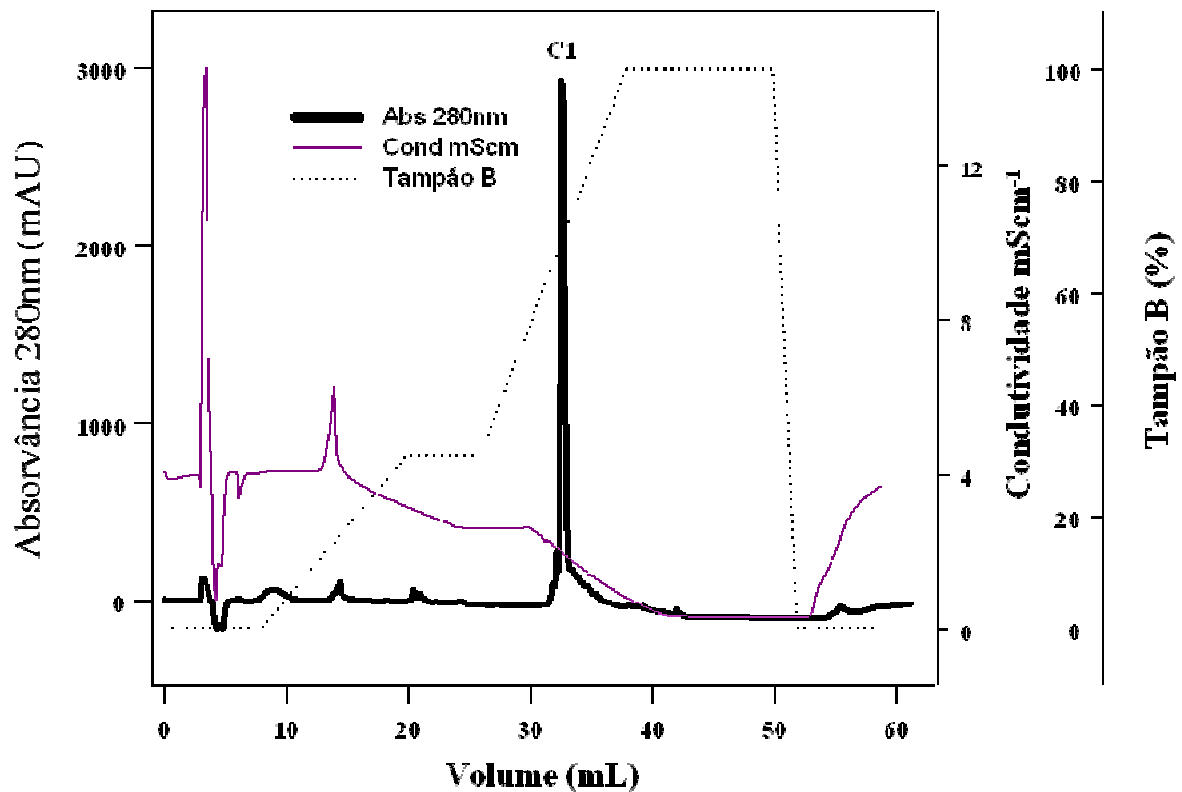


Figura 32. Perfil de eluição da fração MQLm2 em coluna de fase reversa C4. Eluição realizada com gradiente de concentração de Acetonitrila de 0 a 80% em ácido trifluoracético 0,1%. Absorvância monitorada em 280nm, vazão de 1 mL/min, a 25°C e coletou-se 1 mL por tubo.

Em cromatografia de fase reversa, deve-se levar em conta a hidrofobicidade da molécula a ser purificada para a escolha do ligante presente na resina da fase estacionária. Proteínas grandes como LmLAAO tendem a interagir de uma maneira muito forte a resinas com grandes grupos hidrofóbicos, como é o caso de uma coluna com resina C18. Para que ocorra a dessorção de uma enzima como LmLAAO de uma resina C18 é necessária grande quantidade de um solvente que abaixe a polaridade do sistema como é o caso da acetonitrila. (COLLINS et al., 2006). Desde que acetonitrila é um solvente com alta capacidade desnaturante para proteínas, optou-se por uma resina C4, na qual a interação da LmLAAO com a resina hidrofóbica seria mais branda, exigindo uma menor quantidade de solvente apolar para sua eluição. Infelizmente neste passo cromatográfico, LmLAAO começa a eluir com mais de 65% de fase móvel, que contém 80% em acetonitrila, o que justifica a desnaturação da LmLAAO após este passo cromatográfico.

Embora ocorra a perda da atividade, a LmLAAO mostrou-se extremamente pura, como mostrado em SDS-PAGE da Figura 33. Observa-se também que mesmo em condições não redutoras a massa molar corresponde ao monômero da LmLAAO. Na figura 34 está o

plote do logaritmo da massa molar dos padrões usados na eletroforese versus a distância de migração em centímetro.

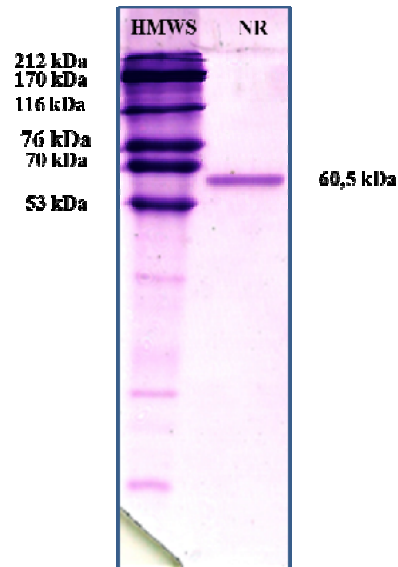


Figura 33. SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da Fração C1 eluída de C4 Shodex® em cromatografia em fase reversa. HMWS - Padrão de massa molar: Miosina 212 kDa, α_2 -macroglobina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, Transferrina 76 kDa, Subunidade da α_2 -macroglobina 70 kDa, Glutamato desidrogenase 53 kDa. NR condições não redutoras.

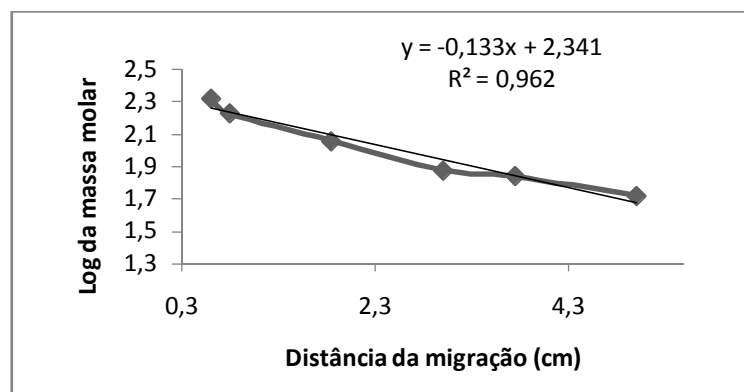


Figura 34. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas em C4 Shodex®. A equação da reta foi determinada pelo plote dos dados de log da massa molar do padrão (HMWS) *versus* a distância de migração (cm) no gel e foi usada para determinar a massa molar das proteínas de interesse.

4.1.2. Protocolo de purificação 2

Um segundo protocolo de purificação foi desenvolvido com o objetivo de obter maiores quantidades de enzima purificada em menor tempo. Uma diferença importante entre os dois protocolos é o uso de sistema fechado em alta pressão no primeiro protocolo (sistema Äkta ® UPC10 - GE Healthcare) e o sistema aberto em baixa pressão usado neste segundo

protocolo. Outra diferença relevante é a massa de peçonha utilizada, sendo 200 mg neste protocolo e apenas 20 mg no protocolo 1.

Como justificado no protocolo de purificação 1 no item 4.1.1 (*Gel Filtração em Sephacryl S-100®*), é interessante o uso de uma técnica de purificação mais branda como a filtração molecular, para que LmLAAO presente na peçonha não sofra desnaturação. Porém neste fracionamento, foi usada uma resina *Sephacryl S200®* empacotada no laboratório, com 220 mL de volume de coluna. O fracionamento por *Sephacryl S200®* apresentou 7 picos principais, denominados SpLm1, SpLm2, SpLm3, SpLm4, SpLm5, SpLm6 e SpLm7, como apresentado na Figura 35.

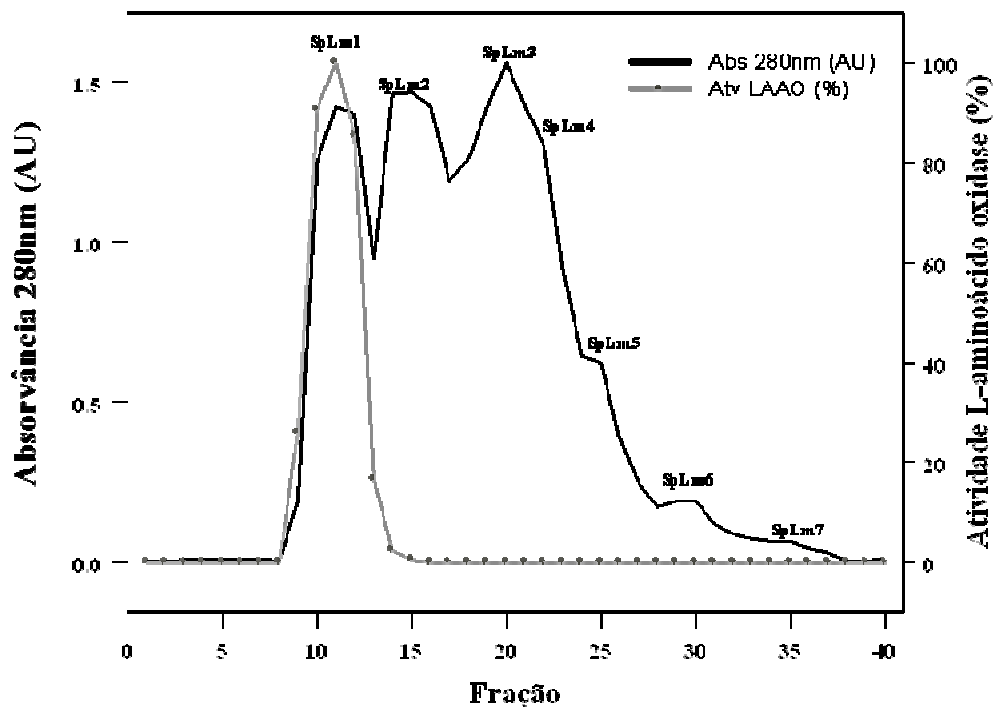


Figura 35. Perfil cromatográfico de eluição da peçonha bruta de *Lachesis muta* em *Sephacryl S200®*. A peçonha de *L. muta* (200 mg) foi dissolvida no tampão de eluição, aplicada à coluna (220 mL de volume de coluna) previamente equilibrada com TrisHCl 20 mM, pH 7,2 a 25°C a uma vazão de 0,5 mL/minuto, e coletou-se 6 mL/tubo.

Foram recolhidas quarenta tubos com 6 mL cada, totalizando 240 mL. A LmLAAO começou a ser eluída da coluna no tubo 8, após 48 mL do início da corrida. Como observado no protocolo de purificação 1 na etapa de gel filtração em *Sephacryl S-100®* (Figura 26), a LmLAAO elui também na primeira fração quando a peçonha é cromatografada em *Sephacryl S-200®* (Figura 35) e a presença da enzima neste pico é comprovada pela sua atividade L-aminoácido oxidase.

A fim de se analisar a composição protéica da fração SpLm1, realizou-se uma SDS-PAGE em condições redutoras e não redutoras, como apresentado na Figura 36.

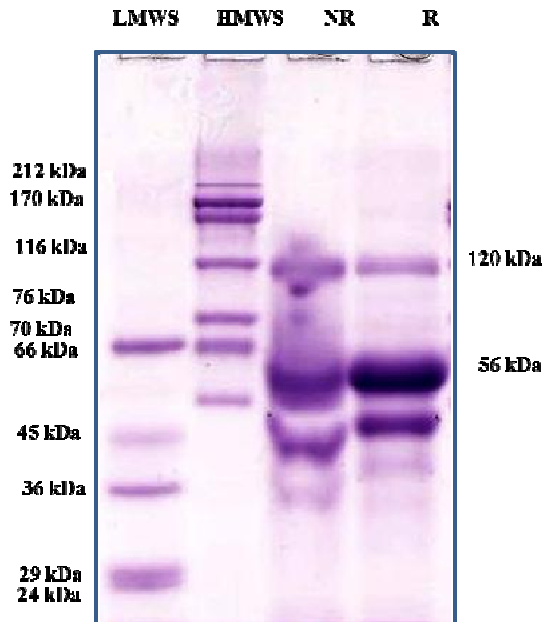


Figura 36. SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da Fração SpLm1 eluída de Sephacryl S200® em cromatografia de gel filtração. HMWS - Padrão de massa molar: Miosina 212 kDa, α_2 -macroglobina 170 kDa, β -galactosidase 116 kDa, Transferrina 76 kDa, Subunidade da α_2 -macroglobina 70 kDa, Glutamato desidrogenase 53 kDa. LMWS - Padrão de massa molar: a) Soralbumina bovina 66 kDa, b) Ovalbumina 45 kDa, c) Gliceraldeído-3-fosfato desidrogenase 36 kDa, d) Anidrase Carbônica 29 kDa, e) Tripsinogênio 24 kDa. **NR** condições não redutoras, **R** condições redutoras

Comparando-se o perfil eletroforético em condições redutoras das proteínas presentes na fração SLM1 eluída de *Sephacryl S100*® com o perfil eletroforético das proteínas presentes na fração SpLm1 eluída de *Sephacryl S200*®, observa-se que no primeiro perfil há a presença de três bandas com massas molares menores que a massa molar da LmLAAO monomérica (57,55 kDa) e que essas três bandas estão em quantidades semelhantes entre si. Já no perfil eletroforético das proteínas presentes na fração SpLm1 eluídas da *Sephacryl S200*®, observa-se a presença de duas banda com massas molares menores que a da LmLAAO monomérica (56 kDa), sendo uma banda principal e a segunda em menor proporção.

Apesar da quantidade de amostra aplicada na *Sephacryl S200*® ser 10 vezes maior que a aplicada na *Sephacryl S100*®, as composições protéicas do primeiro pico das duas filtrações em gel são semelhantes, indicando que a filtração em *Sephacryl S200*® promoveu uma boa resolução entre as proteínas de alta massa molar.

A Figura 37 representa o plote do logaritmo da massa molar dos padrões usados na eletroforese versus a distância de migração em centímetros.

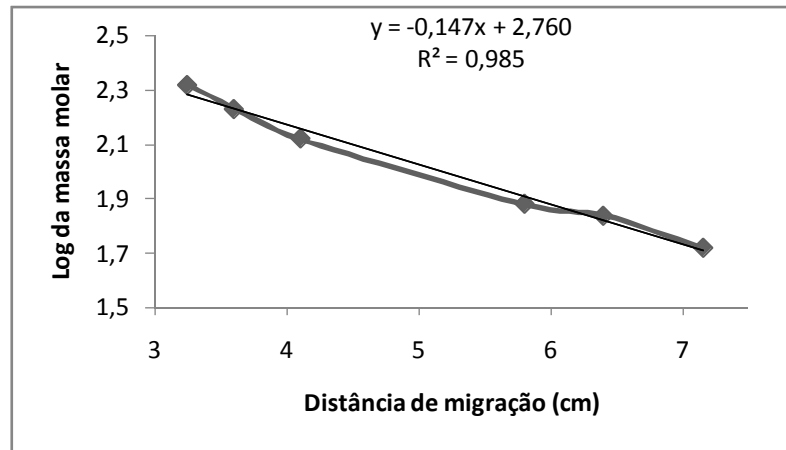


Figura 37. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em *Sephacryl S200*®. A equação da reta foi determinada pelo plote dos dados de log da massa molar do padrão (HMWS) versus a distância de migração (cm) no gel e foi usada para determinar a massa molar das proteínas de interesse.

Interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose® por Cromatografia Clássica

A fração SpLm1 da filtração em gel de *Sephacryl S200*® (Figura 35) foi submetida a cromatografia por interação hidrofóbica, em resina *Phenyl-Sepharose*® (Figura 38). Nesta cromatografia foram eluídas quatro frações denominadas FSLm1, FSLm2, FSLm3 e FSLm4, sendo que a fração FSLm1 apresentou atividade L-aminoácido oxidase (Figura 38).

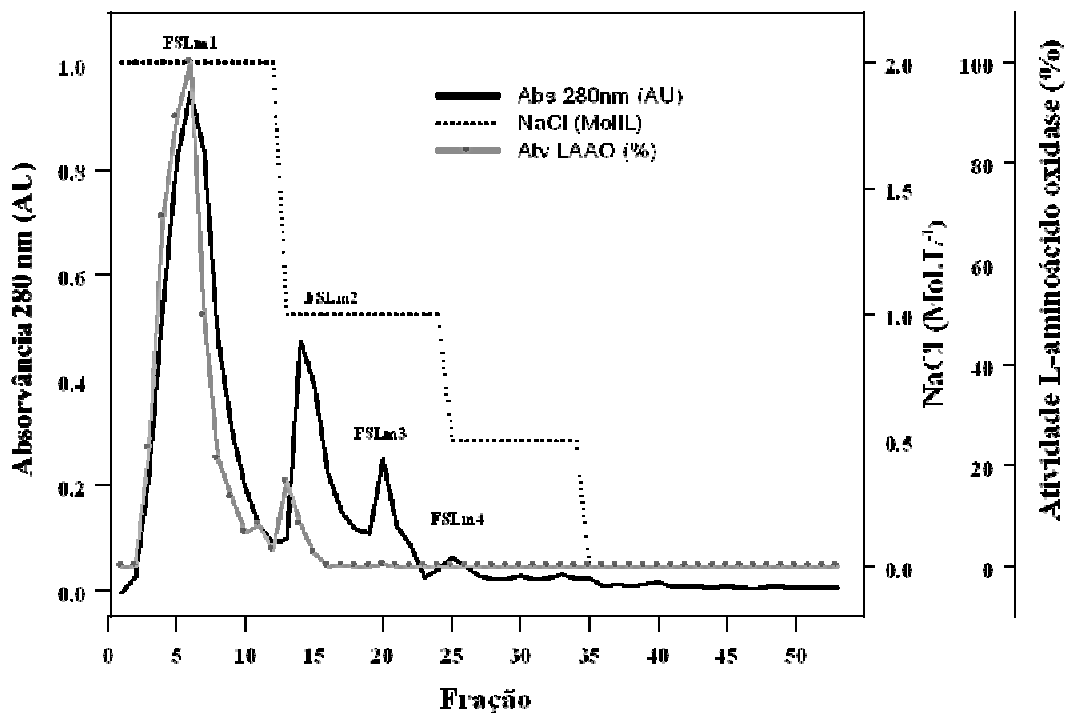


Figura 38: Perfil cromatográfico de eluição da fração SpLm1 proveniente de *Sephacryl S200*® em *Phenyl-Sepharose*®. A fração SpLm1 foi misturada ao primeiro tampão de eluição (TrisHCl 20 mM e NaCl 1M, pH 8,0) e aplicada à coluna com resina *Phenyl-Sepharose*® (25 mL de volume de coluna) previamente equilibrada com TrisHCl 20 mM e NaCl 1M, pH 8,0 a 25°C, a uma vazão de 1 mL/minuto, e coletou-se 3 mL/tubo.

Na cromatografia por interação hidrofóbica, as proteínas são separadas de acordo com a hidrofobicidade de sua superfície. A separação depende também das propriedades do solvente usado. A água em seu estado líquido forma uma rede de moléculas devido às interações do tipo ligação de hidrogênio, promovendo uma coesão forte entre elas. Isso causa uma grande tensão na interface entre água e outro meio e explica porque água pura é um ótimo solvente para moléculas polares desde que existam interações do tipo ligação de hidrogênio entre as moléculas em solução e a água (RUSSEL, 1992). Porém, a água não é um bom solvente para moléculas hidrofóbicas e, em meio aquoso, serão envolvidas por uma rede organizada de moléculas de água. Assim, na cromatografia de interação hidrofóbica usam-se grandes quantidades de sais que possam aumentar a entropia da água e esse aumento da força iônica do meio faz com que as redes ordenadas de moléculas de água sejam desfeitas. Quanto mais intensa for a ruptura desta rede ordenada de água, maior será a interação da molécula a ser purificada com o ligante da resina (OCHOA, 1978; TOMLINSON, 1975).

Para testar a precipitação da LmLAAO em soluções com alta quantidade de sais, foram feitos dois testes com NaCl e com $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$, em diferentes concentrações e optou-se pelo uso do NaCl. Embora o $(\text{NH}_4)_2\text{SO}_4$ seja o sal mais utilizado neste tipo de cromatografia, foi usado o NaCl, pois este sal a 1,5 M provocou o *salting out* de outras proteínas que estavam juntas com a LmLAAO (interagiram fortemente com a resina) sem a necessidade de se colocar um sal diferente na preparação da amostra para essa cromatografia (LmLAAO não foi dialisada depois de sair da gel filtração na qual o tampão utilizado tinha além de Tris HCl 20mM, o NaCl 0,15M). LmLAAO não interagiu com a resina *Phenyl-Sepharose*® e nem foi desnaturada por esse passo cromatográfico (Figura 38).

Para verificar o grau de purificação desse passo cromatográfico, foi realizada uma SDS-PAGE com a fração FSLm1 em condições redutoras e não redutoras (Figura 39).

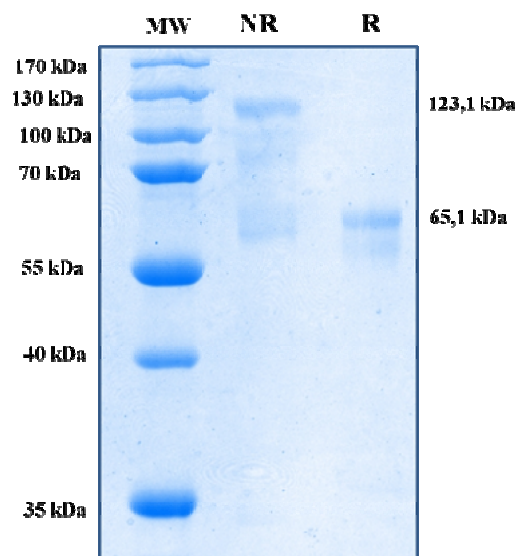


Figura 39. SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da Fração FSLm1 eluída de *Phenyl-Sepharose*® em cromatografia por interação hidrofóbica. Padrão de proteínas usado PAGE RULER™ FERRAMENTAS. **NR** condições não redutoras, **R** condições redutoras

No passo cromatográfico anterior (gel filtração em *Sephacryl S200*®), verificava-se a presença de duas bandas com massas molares menores que a massa molar de LmLAAO em sua condição monomérica e uma delas em concentração proporcionalmente elevada (Figura 36). Na eletroforese da fração eluída de Phenyl-Sepharose® (Figura 39) observa-se ainda um contaminante, mas em concentração significativamente menor, indicando a efetividade deste passo cromatográfico. No entanto, como não foi possível a total purificação da LmLAAO, optou-se por mais um passo cromatográfico, realizado depois de exaustiva diálise para a retirada do NaCl em sistema Centricon® com membrana de 3kDa.

A Figura 40 representa a curva de calibração usada para a determinação da massa das proteínas presentes nesta fração e foi feita com o plote do logaritmo da massa molar dos padrões usados na eletroforese versus a distância de migração em centímetros.

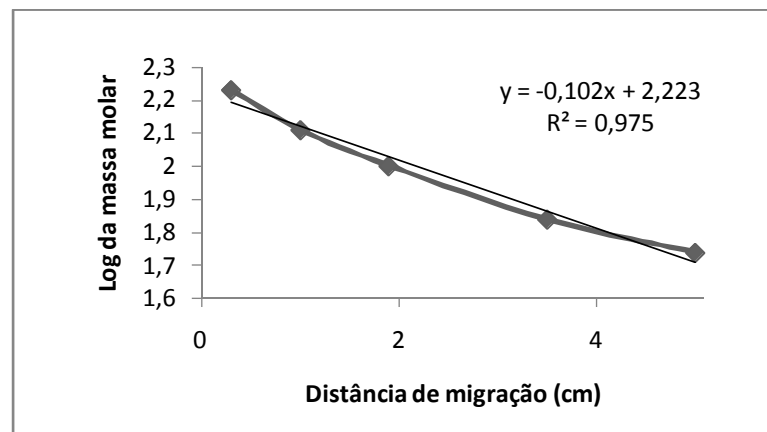


Figura 40. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em Phenyl-Sepharose®. A equação da reta foi determinada pelo plote dos dados de log da massa molecular do padrão (PAGE RULER™ FERRAMENTAS) versus a distância de migração (cm) no gel e foi usada para determinar a massa molecular das proteínas de interesse.

Cromatografia Líquida de Baixa Pressão em Resina Affi –Gel Blue®

O perfil cromatográfico em resina *Affi-Gel Blue*® apresentou três frações principais denominados AfLm1, AfLm2 e AfLm3, sendo que a atividade L-aminoácido oxidase foi detectada na fração AfLm1 (Figura 41).

A resina *Affi-Gel Blue*® é composta de uma matriz de agarose inter cruzada a qual tem ligado covalentemente o corante F3GA-CIBACRON® em quantidade acima de 1,9 mg de corante por mililitro de gel (Figura 22). Esta resina pode ter distintos mecanismos de ligação e eluição da proteína, dependendo da composição dos tampões utilizados na corrida. Dessa forma, quando se espera interações não específicas, podem-se usar tampões com baixa força

iônica. Interações hidrofóbicas são favorecidas com altas concentrações de sais, como sulfato de amônio (SUBRAMANIAN, 1994).

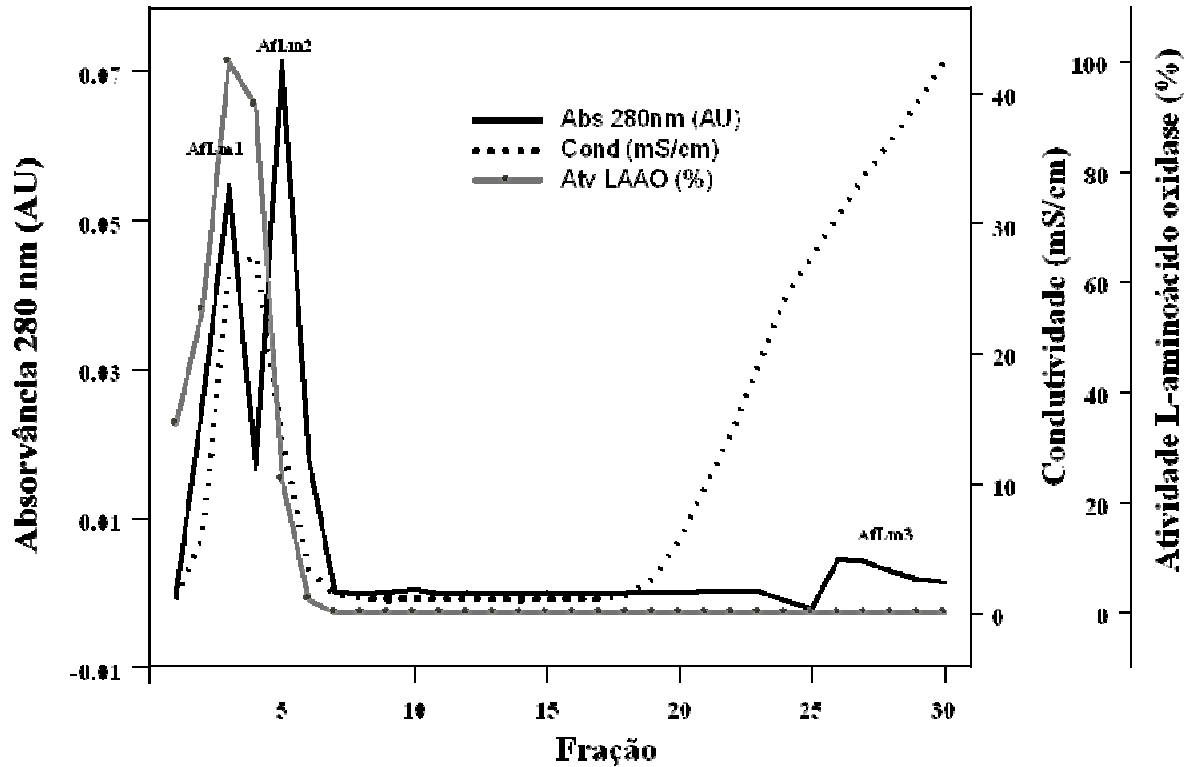


Figura 41. Perfil cromatográfico de eluição da fração FSLm1 proveniente de *Phenil Sepharose*® em *Affi-Gel Blue*®. A fração FSLm1 depois de dialisada foi aplicada à coluna com resina *Affi-Gel Blue*® previamente equilibrada com TrisHCl 20 mM e pH 8,0. Corrida cromatográfica feita com gradiente de concentração de cloreto de sódio até 1,5 M a 25°C a uma vazão de 0,5 mL/minuto, e coletou-se 8 mL/tubo.

Na purificação por este passo cromatográfico, a LmLAAO eluiu na primeira fração, demonstrando não interagir com a resina. Nota-se que o primeiro pico é acompanhado de um aumento da condutividade, causada provavelmente por NaCl residual do passo cromatográfico anterior. No entanto, o principal contaminante da LmLAAO foi eluído posteriormente, permitindo o isolamento da enzima.

Para verificar a pureza de LmLAAO saída desse passo cromatográfico foi realizada uma SDS-PAGE da fração AfLm1 em condições redutoras e não redutoras, apresentada na Figura 42.

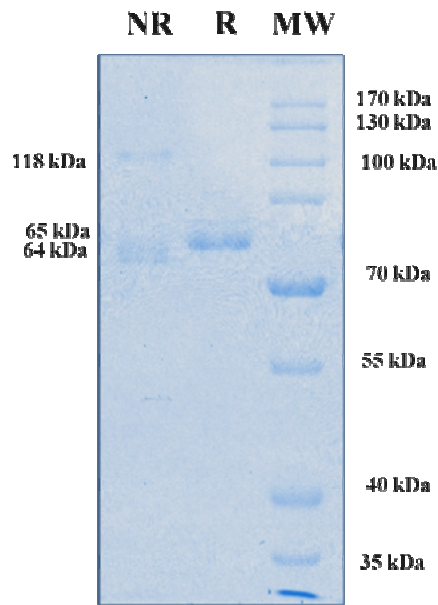


Figura 42: SDS-PAGE (10% poliacrilamida) da Fração AfLm1 eluída de *Affi-Gel Blue®*. Padrão de proteínas usado PAGE RULER™ FERRAMENTAS. **NR** condições não redutoras, **R** condições redutoras.

O plote do logaritmo da massa molecular dos padrões usados na eletroforese versus a distância de migração em centímetros para determinação da massa molar das proteínas neste gel está representado na Figura 43.

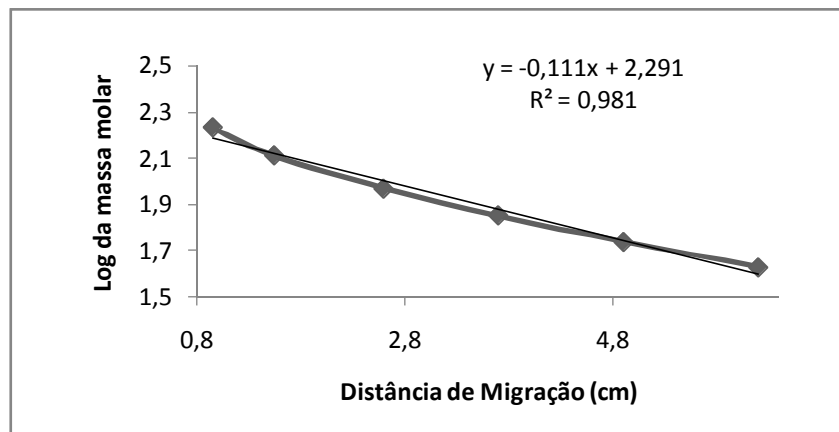


Figura 43. Curva de calibração para determinação da massa molar de proteínas purificadas em *Affi-Gel Blue®*. A equação da reta foi determinada pelo plote dos dados de log da massa molar do padrão (PAGE RULER™ FERRAMENTAS) versus a distância de migração (cm) no gel e foi usada para determinar a massa molar das proteínas de interesse.

A presença de banda única com 65kDa em condições redutoras mostra a pureza da LmLAAO depois destes três passos cromatográficos. Porém, a enzima purificada foi submetida a uma cromatografia de fase reversa, para confirmar sua pureza e, ao mesmo tempo, preparar a amostra para a análise por espectrometria de massas.

Fase reversa em coluna C4 em sistema de Cromatografia Líquida de Alta Eficiência.

Esta etapa cromatográfica foi realizada com a ajuda do Dr. Bruno Lomonte, do Instituto Clodomiro Picado, na Costa Rica. A cromatografia em fase reversa em coluna C4 analítica Vydac® (Figura 44-A) comprovou a pureza de LmLAAO, também evidenciada pela presença de banda eletroforética única em SDS-PAGE (Figura 44-B). A amostra proveniente dessa cromatografia foi usada para a determinação da massa molar por espectrometria de massas.

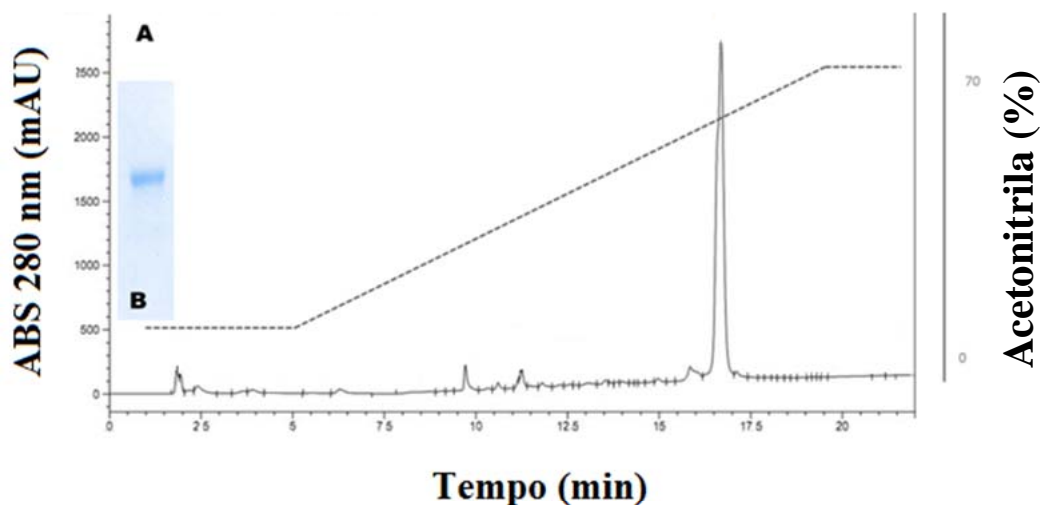


Figura 44. Perfil cromatográfico de eluição da fração AfLm1 em coluna C4 analítica Vydac®. (A) A fração AfLm1 foi aplicada à coluna C4 analítica Vydac® previamente equilibrada com TFA 0,1%. Corrida cromatográfica feita com gradiente de concentração de acetoneitrila 70% a 25°C a uma vazão de 1,0 mL/minuto. (B) SDS-PAGE (10% em acrilamida) da fração eluída da coluna C4.

Nas Tabelas 1 e 2 estão os estudos de recuperação de LmLAAO depois de passar por protocolo de purificação 1 e protocolo de purificação 2. Estão também representadas nas tabelas para cada fração utilizada, (a) a *recuperação proteica total*, que é a quantidade de proteína recuperada em sua totalidade na fração cromatografada com atividade LAAO, (b) a *recuperação proteica total em porcentagem*, a qual representa o quanto foi recuperado de proteína em relação à quantidade total de peçonha usada no protocolo de purificação, (c) a *atividade LAAO total* da fração, a quantidade de *LmLAAO ativa recuperada* na fração, dado que se pode recuperar LmLAAO, porém sem sua capacidade catalítica preservada, (d) a porcentagem de LmLAAO ativa na peçonha além da (e) *atividade específica* da LmLAAO.

Para a tabela de recuperação referente ao protocolo de purificação 1 (tabela 1), LmPB representa a peçonha bruta de *Lachesis muta*, SLm1 representa os dados da fração recuperada da cromatografia em gel filtração em *Sephacryl S100*®, e MQ2 representa os dados da fração recuperada da cromatografia por troca iônica realizada em resina *MonoQ*®. Para a Tabela de recuperação referente ao protocolo de purificação 2 (tabela 2) LmPB representa a peçonha

bruta de *Lachesis muta*, SpLm1 representa os dados de recuperação da fração saída com atividade L-aminácido oxidase da cromatografia por gel filtração em *Sephacryl S200*®, FSLm1 representa os dados da fração recuperada de cromatografia por interação hidrofóbica em *Phenyl-Sepharose*® e AfLm1 representa os dados da fração recuperada de Affi-Gel Blue®. As etapas de cromatografia em fase reversa não foram analisadas devido a total perda de atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO.

Tabela 1. Recuperação protéica e recuperação da atividade LAAO de cada fração cromatografada pelo protocolo de purificação 1.

Fração	Proteína (mg)	Proteína (%)	Atividade LAAO (U)*	Atividade LAAO (%)	Atividade Específica (U/mg)**
LmPB ***	19,3	100	2.150	100	111
SLm1 Sephacryl S100®.	1,41	7,25	1.045	48,6	741
MQ2 (LmLAAO) MonoQ®	0,84	4,35	890	41,4	1060

* Uma unidade de atividade LAAO (U) é definida como quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por minuto.

** Atividade específica é a quantidade em µmol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) liberado por minuto por mg de LmLAAO.

*** *LmPB*: Peçonha de *L. muta*

Tabela 2. Recuperação protéica e recuperação da atividade LAAO de cada fração cromatografada pelo protocolo de purificação 2.

Fração	Proteína (mg)	Proteína (%)	Atividade LAAO (U)*	Atividade LAAO (U)*	Atividade Específica (U/mg)**
LmPB ***	200	100	72.750	100	364
SpLm1 Sephacryl S200®.	78,50	31,71	67.159	92,3	856
FSLm1 Phenyl Sepharose®.	40,56	20,28	41.966	57,7	1035
AfLm1 Affi-gel®	17,14	8,57	29.005	39,9	1692

* Uma unidade de atividade LAAO (U) é definida como quantidade de enzima capaz de liberar 1,0 µmol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) por minuto.

** Atividade específica é a quantidade em µmol de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) liberado por minuto por mg de LmLAAO.

*** *LmPB*: Peçonha de *L. muta*

Observando-se as tabelas de recuperação referente aos protocolos de purificação 1 e 2, nota-se que a **recuperação protéica total** de LmLAAO é aproximadamente duas vezes maior no protocolo de purificação 2 (protocolo de purificação 1, 4,35% e protocolo de purificação 2, 8,57%). Este resultado pode ser explicado pela maior quantidade de peçonha bruta injetada no protocolo de purificação 2, que é 10,4 vezes maior que a quantidade injetada no protocolo de purificação 1. Este resultado também pode ser explicado pela maior proporção de toxinas pouco solúveis na dissolução de peçonha usada no primeiro protocolo (pH 7,2), uma vez que esta amostra foi menos concentrada (19,3 mg / 0,5 mL) do que a utilizada no protocolo 2 (200 mg / 3 mL) tendo como consequência, uma redução da proporção LAAO na mistura. Isso também explica a menor **atividade específica** encontrada na dissolução da peçonha utilizada no protocolo 1 (111 U / mg) em comparação com a do protocolo 2 (364 U / mg). Com relação à atividade específica, observa-se que o protocolo de purificação 1 purificou a enzima em um fator de 9,5 vezes e que o protocolo de purificação 2 purificou a enzima em um fator de 4,7 vezes.

Com relação à recuperação da **atividade enzimática** de LmLAAO, os dois protocolos são semelhantes (recuperação de 41,4% no protocolo 1 e 39,9% no protocolo 2).

4.2. Ensaio de atividade L-aminoácido-oxidase

O ensaio de determinação de atividade L-aminoácido oxidase é colorimétrico e os valores de absorvância correspondem proporcionalmente à formação de um cátion cromóforo de cor amarela gerado pela oxidação de *o*-fenilenediamino por elétrons provenientes da peroxidase de rabanete. A peroxidase é oxidada pelo peróxido de hidrogênio (SANTOS, 2005) o qual por sua vez foi gerado em uma reação paralela de reoxidação do cofator FAD da LAAO por oxigênio molecular (Figura 24).

4.3. Estudos de cinética enzimática

4.3.1. Determinação da especificidade da LmLAAO frente a diferentes aminoácidos

A atividade da LmLAAO depende, como em outras enzimas, da sua estrutura. Considera-se que a enzima tenha um sítio de ligação contendo de três a quatro subsítios hidrofóbicos cada um acomodando um carbono metil/metileno, facilitando, assim a ligação com aminoácidos hidrofóbicos (TAN, 1998).

Os resultados apresentados na Figura 45 mostram a tendência da LmLAAO em clivar aminoácidos com cadeia lateral apolar alifática (L-metionina, L-leucina e L-isoleucina) e aminoácidos com cadeia lateral apolar aromática (L-fenilalanina, L-triptofano e L-tirosina). A preferência catalítica pode ser explicada pela presença de aminoácidos estruturais que promovem um ambiente apolar no sítio catalítico. Este comportamento repete-se em LAAO de outras serpentes como *Naja naja oxiana* (SAMEL *et al.*, 2008), *Bothrops pirajai* (IZIDORO *et al.*, 2006), *Calloselasma rhodostoma* (ANDE *et al.*, 2008) e *Vipera lebetina* (TONISMAGI *et al.*, 2006), mostrando que o sítio catalítico tem uma estrutura conservada entre as espécies de serpentes.

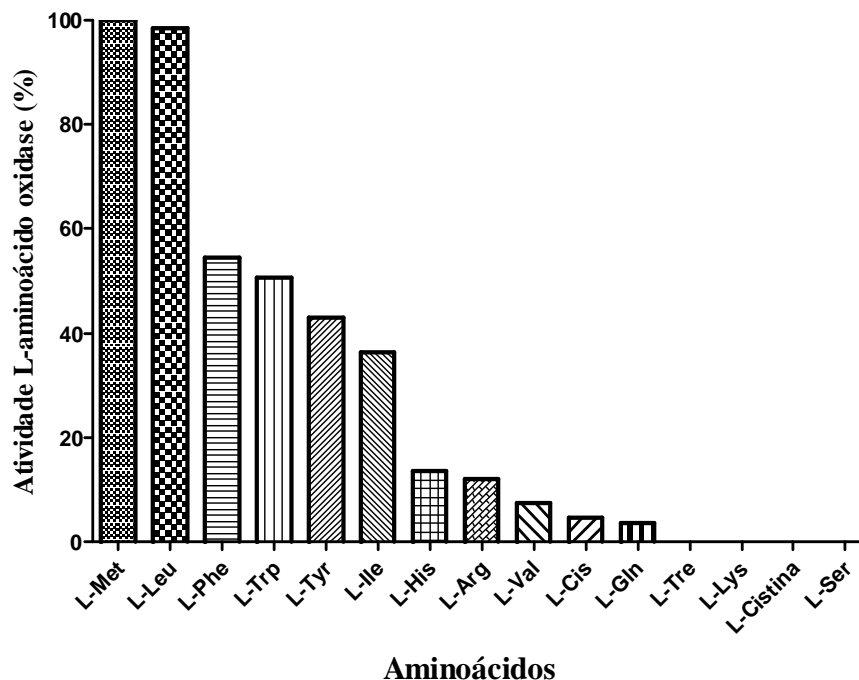


Figura 45. Preferência catalítica da LmLAAO frente diferentes aminoácidos. Controle preparado com Tris-HCl 0,05 M, pH 7,2 à 25°C.

A partir desses resultados, optou-se por usar sempre L-Leucina como substrato no meio reacional do ensaio para avaliar a atividade L-aminoácido oxidase.

4.3.2. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio

A determinação da atividade LAAO é expressa em μmoles de H_2O_2 liberados no meio reacional por minuto. Assim foi necessária uma curva de calibração de peróxido de hidrogênio em meio reacional da LAAO Figura 46.

A atividade L-aminoácido oxidase dos ensaios posteriores foi calculada com base na relação absorvância/produção de peróxido de hidrogênio utilizando a equação de reta gerada na curva de calibração da Figura 46.

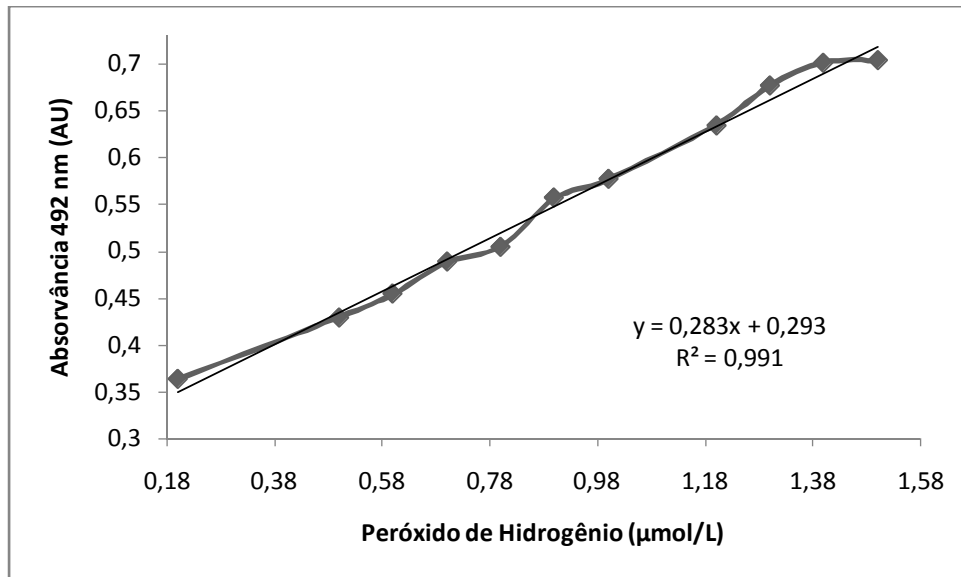


Figura 46. Curva de calibração de peróxido de hidrogênio. Peróxido de hidrogênio (μmol) em meio reacional simulando o meio de atividade L-aminoácido oxidase. Absorvância determinada em 492 nm.

4.3.3. Determinação do melhor pH do meio reacional para a atividade da L-aminoácido oxidase de *Lachesis muta* e influência do pH de incubação para sua atividade

O pH mais adequado do meio reacional para a perfeita atividade de LmLAAO é 8,0, como demonstrado na Figura 47 (valores foram obtidos por triplicata e estão representados por média da porcentagem de atividade \pm desvio padrão). Valores de pH acima e abaixo deste podem provocar alterações estruturais e, conseqüentemente, cinéticas tanto da LmLAAO quanto da peroxidase de rabanete presente no ensaio. Tal fato é demonstrado pela perda de quase 50% da atividade catalítica de LmLAAO em pH 7,0. A partir deste experimento, o pH do meio reacional para determinação de atividade LAAO foi sempre mantido em 8,0.

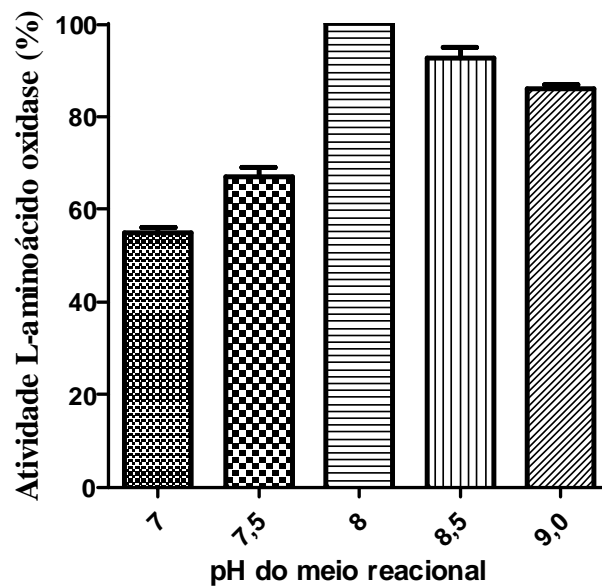


Figura 47. Dependência da variação de pH para atividade L-aminocido oxidase em ensaio colorimétrico determinado por *o*-fenilenodiamino em microplaca. Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

Valores baixos de pH, como 4, diminuem drasticamente (cerca de quatro vezes) a atividade catalítica da LmLAAO. Em pH 10 a enzima perdeu completamente sua atividade, como demonstrado na Figura 48. Os dados foram obtidos em ensaio realizado em triplicata e representam a média da liberação de peróxido de hidrogênio (μmol).

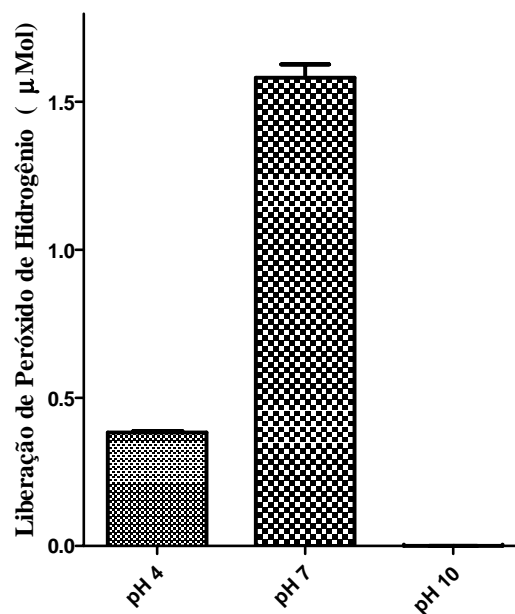


Figura 48. Dependência da variação de pH para atividade L-aminocido oxidase quando LmLAAO é incubada por 30 minutos em tampões com diferentes pHs. Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

A perda de atividade enzimática em valores altos de pH também foi observada em LAAO de *Daboia russelli russelli* (MANDAL e BHATTACHARYYA, 2008).

4.3.4. Determinação da atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO depois de pré-incubada em diferentes temperaturas

Dados de literatura mostram que a atividade de LAAOs de diferentes origens sofrem alterações significativas com a temperatura de armazenamento. Para avaliar a estabilidade da LmLAAO em função da temperatura, sua atividade catalítica foi determinada após a mesma ter sido pré-incubada em água por 1 hora em diferentes temperaturas. A figura 49 mostra a média dos valores de liberação de peróxido de hidrogênio de ensaio realizado em triplicata.

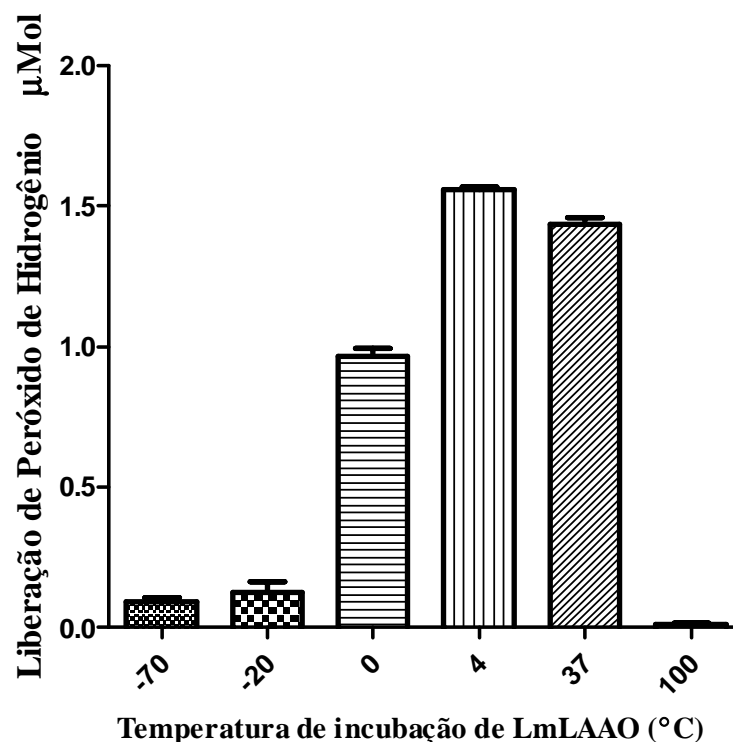


Figura 49. Dependência da variação de temperatura para atividade L-aminoácido oxidase A atividade catalítica da LmLAAO foi determinada após a mesma ter sido pré-incubada em água por 1 hora em diferentes temperaturas. Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

Nota-se a grande perda de atividade de LmLAAO depois de congelada. Este experimento realizado em função da necessidade de determinar a melhor temperatura para armazenar a LmLAAO depois de purificada. Em um procedimento comum no trabalho com toxinas animais, a LmLAAO foi descongelada depois de ter sido mantida a -70°C por 3 dias e submetida a

ultrafiltração em sistema Centricon®, na tentativa de se concentrar a amostra para experimentos posteriores. Após a ultrafiltração, notou-se que uma solução amarelada passou pela membrana de 3 kDa, fato não comum em amostras de LmLAAO que não foram congeladas. Para verificar um possível rompimento da membrana de ultrafiltração, avaliou-se a atividade L-aminoácido oxidase dessa fração e nenhuma atividade catalítica foi detectada. A mesma fração foi submetida a uma análise colorimétrica, e a mesma absorveu luz no comprimento de onda ao redor de 450 nm, comprimento de onda no qual o cofator FAD absorve luz. Este resultado indica que, entre outros fatores, a perda de atividade L-aminoácido oxidase da LmLAAO após o congelamento é devida ao desligamento do cofator de sua estrutura.

A perda de atividade depois de congelamento também foi observada com a LAAO de *Crotalus adamanteus* (CURTI et al., 1968). Observa-se também a perda total de atividade L-aminoácido oxidase de amostras que foram submetidas a temperaturas altas, como 100°C. Estudos de Hu et al. (1982) demonstraram que a intensidade de redução da atividade catalítica com a temperatura é muito variável entre as LAAOs isoladas de diferentes organismos. A LAAO de *Ophiophagus hannah* (LEE et al., 2011) não perde a atividade em altas temperaturas, mas a LAAO de *Daboia russelli russelli* perde drasticamente a atividade se mantida a 60°C por 10 minutos (MANDAL e BHATTACHARYYA, 2008). Dessa forma, para os ensaios catalíticos posteriores o “branco” sempre foi feito com a enzima fervida, mantendo todos os demais constituintes do ensaio. A LmLAAO é melhor conservada a 4°C.

4.3.5. Determinação de K_m e V_{max} da LmLAAO

A atividade cinética da LmLAAO, como já dito anteriormente, é medida pela capacidade de liberação de peróxido de hidrogênio, por meio da clivagem de L-Leu e reoxidação do cofator FAD da enzima. A LmLAAO mostrou uma cinética michaeliana na catálise do seu substrato, em ensaio para atividade L-aminoácido oxidase realizado como descrito por Kishimoto e Takahashi (2001), com modificações (modificações apresentadas em material e métodos). A sua atividade foi significativamente inibida em concentrações de substrato acima de 3 mmol/L. Em dados não apresentados, a atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO foi perdida. Este fato é comprovado pela diminuição da cor amarela do ensaio, a qual é determinada pela oxidação de *o*-fenilenodiamino pela peroxidase de rabanete. Esta inibição pode ser explicada pela ligação de substrato à enzima antes que o cofator FAD seja reoxidado (MOUSTAFA, 2006). A determinação de K_m e V_{max} para o substrato L-Leucina foi realizada por derivação da curva elíptica de Michaelis-Menten pelo programa gráfico *Graph Pad Prism 5.0* (Figura 50). Esse *software* foi utilizado pela confiabilidade no ajuste dos dados em regressão não linear.

A constante de Michelis-Menten é a concentração de substrato na qual a velocidade de reação é a metade da velocidade máxima (VOET e VOET, 1995). A LAAO de *Lachesis muta* apresentou para a L-Leucina K_m de $0,9737 \text{ mmol/L} \pm 0,0736 \text{ mmol/L}$ e V_{\max} de $0,06345 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \pm 0,002089 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. O intervalo de confiança foi mantido em 95% (para K_m 0,8097 a 1,138 e para V_{\max} 0,05880 a 0,06811) com 8 graus de liberdade.

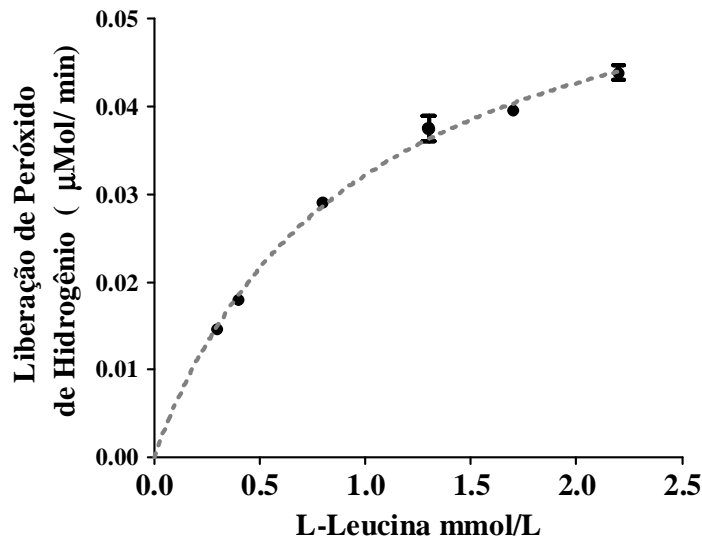


Figura 50. Velocidade catalítica da LmLAAO em função da concentração de substrato: cinética Michalis-Menten. São correlacionadas a velocidade ($\mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$) de produção de peróxido de hidrogênio pela clivagem de L-Leucina pela LmLAAO em função da quantidade de L-Leucina (mmol/L) presente no meio reacional. K_m de $0,9737 \text{ mmol/L} \pm 0,0736 \text{ mmol/L}$ e V_{\max} de $0,06345 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1} \pm 0,002089 \mu\text{mol}\cdot\text{min}^{-1}$. Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

Embora diferentes LAAOs de serpentes tenham tendência a clivar L-aminoácidos hidrofóbicos (DU e CLEMETSON, 2002), há muita variação entre os ensaios de determinação de atividade L-aminoácido oxidase. Os ensaios são baseados normalmente na produção de peróxido de hidrogênio pela atividade catalítica de LAAO e determinados colorimetricamente. No entanto, variações que vão desde o tampão usado no meio, pH e até mesmo variação do cromóforo (uso de *o*-dianisina ao contrário de *o*-fenilenodiamino), são freqüentes e não permitem a comparação direta entre os valores de K_m para L-Leucina encontrados em diferentes trabalhos. De qualquer forma, para a LAAO de *Agkistrodon blomhoffi ussurensis*, em meio reacional contendo *o*-dianisina como cromóforo, o K_m para a L-Leu foi de $2,1 \text{ mmol/L}$ (SUN et al., 2010). Para as duas isoformas de LAAO de *Daboia russelli russelli* os K_m para L-Leu encontrados foram $0,750$ e $0,599 \mu\text{mol/L}$, respectivamente (MANDAL e BHATTACHARYYA, 2008), e $60,69 \text{ mmol/L}$ para a LAAO de *Bungarus fasciatus* (WEI et al., 2009).

4.4. Sequenciamento amino-terminal

A Tabela 3 representa o sequenciamento dos resíduos a partir da extremidade amino-terminal da LmLAAO, realizado no sequenciador de proteínas automatizado da marca Shimadzu (Sistema PPSQ-33A). O fenilisotiocianato (PITC) liga-se ao último resíduo em seu N terminal, que passa pelas etapas reacionais da degradação de EDMAN (EDMAN e BEGG, 1967) e forma PTH-aminoácido, o qual foi identificado em cromatografia de fase reversa.

Tabela 3. Sequência amino-terminal dos 40 primeiros resíduos da LmLAAO.

10	20	30	40
ADDRNPLGECFRET DYEEFLEIAKNGLRATS NPKHVIVGA			

4.5. Clonagem e sequenciamento de cDNA da LmLAAO

A clonagem e o sequenciamento do cDNA da LmLAAO foram realizados pelos Dr. Paulo Lee Ho e Dr. Inácio Junqueira-de-Azevedo do Instituto Butantan. Na sequência apresentada na Tabela 4, o peptídeo sinal está assinalado em negro e o N-terminal com letras vermelhas. Os sítios de N-glicosilação¹ estão realçados em cinza e foram preditos por software *NetNGlyc*. (<http://www.cbs.dtu.dk/services/NetNGlyc/>)

Tabela 4. Sequência em aminoácidos da LmLAAO deduzida da sequência do cDNA.

1234567890123456789012345678901234567890123456789012345678901234567890

ADDRNPLGECFRET DYEEFLEIAKNGLRATS NPKHVIVGAGMSGLSAAAYVL

AEAGHQVTVLEASERAGGRVRYRNDKEGWYANLGPMLRPEKHRI VREYIRKFGQLNFHQENDNAWHFI

KNIRKRVGEVKEDPGLLQYPVKPSEGKSAGQLYEESLGKVAEELKR**TNCS**YILNKYD TYSTKEYLLKEGN

LSPGAVDMIGDLLNEDSGYYVSFIESLKHDDIFGYEKRFDEIVDGMKLP TSMYQAIKEKVRFNARVIKI

QQNDREVTVYQTSANEMSPVTADYVIVCTTSRATRRTFEPPLPPKHAHALRSVHYRSGTKIFLTCTKK

FWEDDGIRGGKSTTDLPSRFIYYPNHNP**NFT**SGVGVIIAYGIGDDANFFQALDFKDCGDIVINDLSLI

HQLPKKDIQTFYCPSMIQRWSLDKYAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPFKRIYFAGEYTAQFHGWIDSTI

KSGLTAARDVNRASE**NPS**GIHLSNDNEL

¹ N-Glicosilação corresponde à adição de oligossacarídeos ao grupo NH₂ da Asparagina em posições definidas e é uma das principais modificações pós-traducionais (MAIA e LEITE, 2001).

Os resíduos passíveis de glicosilação preditos são Asn 172 (sequon¹ **Asn** - Cys - Ser - Tyr) e Asn 361 (sequon **Asn** – Phe – Thr – Ser) , os quais apresentaram resultado positivo do software por apresentarem potencial acima de 0.5 (Tabela 5). *Jury agreement* apresentado na Tabela 5 é o número de redes neurais que apresentam o resultado concordante com o apresentado por este software. Segundo Pawelek et al. (2000) os sítios de glicosilação para LAAO de *Caloselasma rhodostoma* coincidem com os sítios preditos por *NetNGlyc* para LmLAAO, ou seja, Asn172 e Asn361.

Tabela 5. Sequons presentes na LmLAAO e seus potenciais sítios para N-glicosilação

SeqName	Position	Potential	Jury agreement	N-Glyc result
Sequence	172 NCSY	0.6643	(8/9)	+
Sequence	194 NLSP	0.1872	(9/9)	---
Sequence	361 NFTS	0.6881	(8/9)	+
Sequence	486 NPSG	0.4477	(8/9)	-

Segundo o *software NetOglyc* a LmLAAO não tem um sítio potencial de *O*-glicosilação².

4.6. Análise *in Silico*

4.6.1. cDNA da LmLAAO

Os parâmetros físico-químicos teóricos preditos pelo programa ProtParam mostraram para os 498 aminoácidos da LmLAAO, uma massa molar de 56538.7 Da e um pI³ teórico de 6,28. Os coeficientes de extinção foram dados em M⁻¹ cm⁻¹, em 280 nm e medidos em água. Considerando-se que todos os pares de cisteínas formam cistina, o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280nm}^{1mg/mL}$) é 1,178. Assumindo-se que todos os resíduos de cisteína estão reduzidos, o coeficiente de extinção molar ($\epsilon_{280nm}^{1mg/mL}$) é 1.172. O índice alifático⁴ calculado para a LmLAAO foi de 75,45.

¹ Sequon é uma sequência de três aminoácidos na proteína que serve de sítio de ligação para um polissacarídeo (MARSHALL, 1974)

² *O*-Glicosilação corresponde à adição de oligossacarídeos ao grupo OH da Serina ou Treonina e é também uma das principais modificações pós-traducionais (TAN et al, 2003).

³ O valor teórico do ponto isoelétrico (pI) é calculado a partir do pKa de cada aminoácido da proteína.

⁴ Índice alifático é a medida do volume ocupado pela cadeia lateral de Alanina, Valina, Leucina e Isoleucina. Quanto maior o índice alifático, maior a termo-estabilidade da proteína (IKAI, 1980)

A Figura 51 mostra as relações filogenéticas e as distâncias evolucionárias entre as estruturas primárias da LmLAAO e da LAAO de outras serpentes:

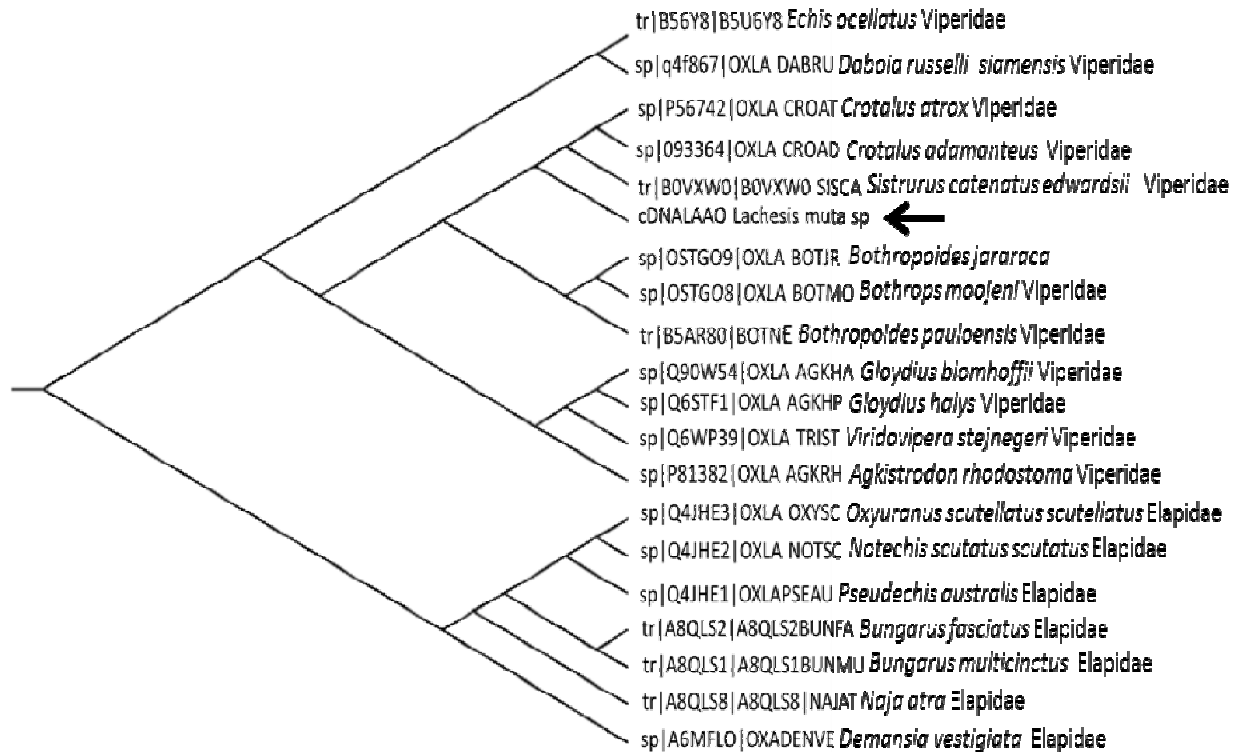


Figura 51. Cladograma mostrando as relações filogenéticas entre as estruturas primárias de LmLAAO e LAAOs de outras espécies de serpentes.

De acordo com a comparação feita pelo banco de dados, a LmLAAO possui 91% de identidade com as LAAOs de *Sistrurus catenatus edwardsii*, e de *Crotalus atrox* e 90,6% de identidade com a LAAO de *Crotalus adamanteus*. Apresentou também 90% de identidade com a de *Agkistrodon halys pallas*, a qual foi usada como estrutura base para a modelagem molecular. Como observado pela Figura 51 a LmLAAO tem sequência muito similar com a LAAO de outros Viperideos de Subfamília Crotalinae, e tem menos similaridade com a sequência de LAAO de Elapideos.

A Figura 52 mostra o alinhamento sequencial entre os aminoácidos de LmLAAO e os aminoácidos de LAAO de outros organismos. Como dito anteriormente, a LmLAAO partilha maior identidade com a LAAO de *Sistrurus catenatus edwardsii*, uma serpente da família viperidae presente principalmente no Canadá, Estados Unidos e norte do México (MACKESSY, 2005). A sequência da LmLAAO obtida por cDNA <Lachesis> foi alinhada pelo MultAlin (CORPET, 1988) com a sequência de LAAOs de diferentes serpentes como

Sistrurus catenatus edwardsii <**Sistrurus**> (UniProt - B0VXW0_SISCA), *Crotalus atrox* <**Crotalus**> (UniProt – P56742 OXLA_CROAT), *Bothropoides pauloensis* <**Bothropoides**> (SP:OXLA_BOTPA), *Gloydius halys* <**Gloydius**> (SP:OXLA_GLOHA), *Agkistrodon halys pallas* <**Agkistrodon**> (RCSB-PDB-1REO), *Caloselasma rhodostoma* <**Caloselasma**> (RCSB-PDB 2IID)

Teoricamente, a LmLAAO apresenta em sua estrutura terciária 18 α -hélices (como visto na Figura 52), 9 hélices tipo 3_{10} , nas quais os aminoácidos estão dispostos em uma estrutura helicoidal no sentido horário (indicado na Figura 52 com o símbolo η), e 8 turnings, (representado na Figura 52 como TT).

Regiões importantes para a funcionalidade enzimática estão conservadas nas LAAOs das diferentes espécies de serpentes. A Asn172 e a Asn 361 são resíduos conservados e é nesses resíduos que estão presentes as N-glicosilações (PAWELEK et al., 2000), as quais serão importantes para a interação entre LAAOs e a superfície celular. Essa interação aumenta a concentração de H_2O_2 na região da interação, aumentando a toxicidade celular (GEYER, et al. 2001).

Para a reação de catálise mediada por LAAO é importante a ação de His 223 e Arg 322, resíduos que são conservados nas sequências de LAAOs alinhadas da Figura 52. Esses dois resíduos alteram as conformações de suas cadeias laterais. His 223 transfere o par de elétrons do nitrogênio do anel imidazol para o nitrogênio do carbono α do aminoácido substrato, com concomitante perda de hidreto para a formação do iminoácido (MOUSTAFA et al., 2006)

Como mostrado anteriormente, a perda do cofator FAD por congelamento da LmLAAO fez com que a enzima perdesse a atividade. Assim a presença do cofator e sua redução e reoxidação estão diretamente ligadas com a função enzimática de LAAO. Todas as LAAOs utilizadas no alinhamento apresentam a Lys 326 conservada e segundo Pawelek et al., (2000), esse resíduo é importante porque faz uma ligação de hidrogênio com uma molécula de água que também está interagindo com o N5 do anel aloxazina do cofator FAD. A presença da Lys 326 auxiliaria o ataque da água ao iminoácido intermediário na clivagem não enzimática, transformando-o no α -cetoácido correspondente (Figura 11). Além do mais, os resíduos Phe 328, Ile 370, Tyr 372, Tyr 356, Met 89 e Leu 86 também estão conservados nas LAAOs alinhadas, e esses resíduos formam um ambiente hidrofóbico ao redor da Lys 326 (PAWELEK, et al. 2006).

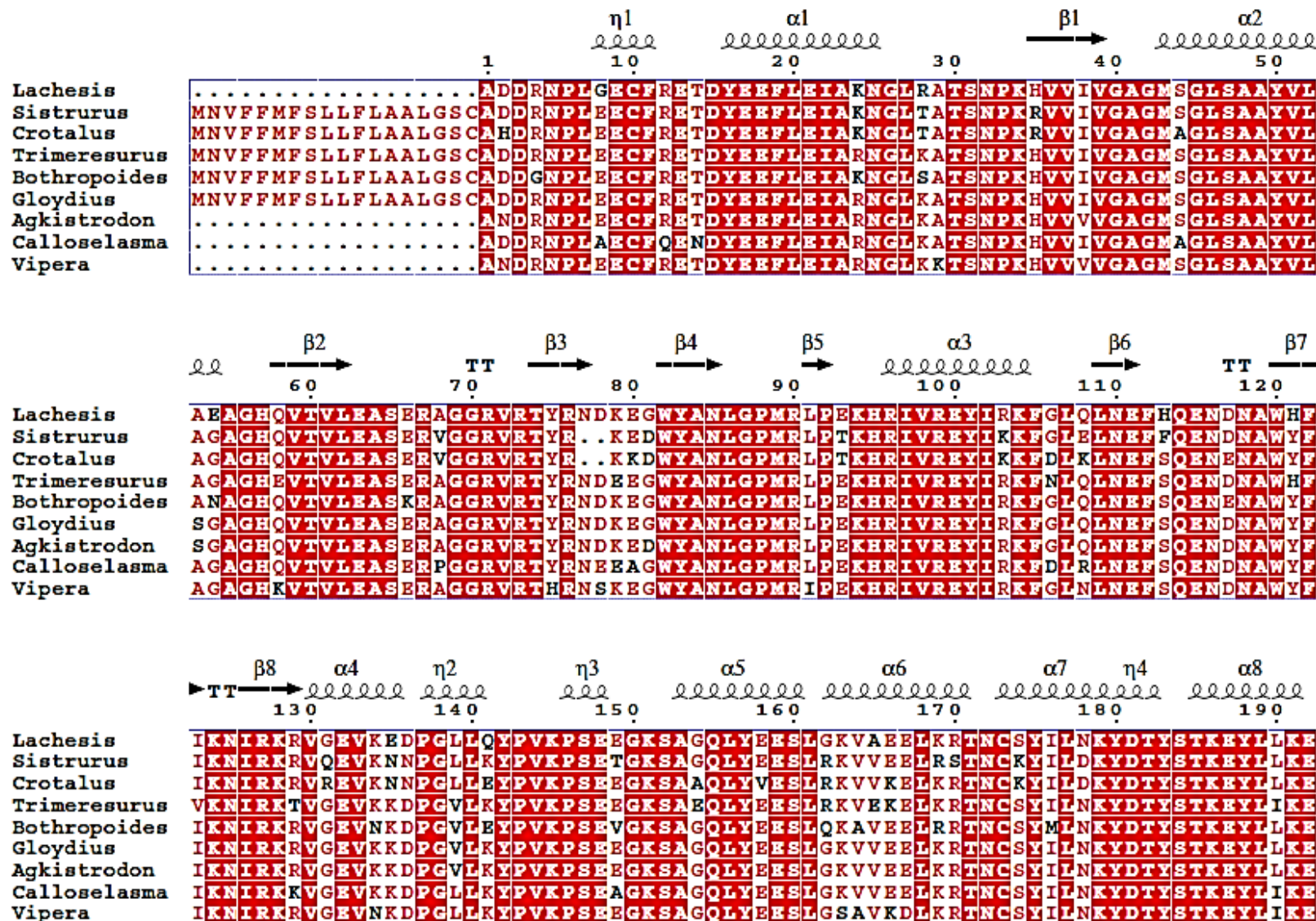


Figura52a. Alinhamento múltiplo realizado no MultAlin entre LmLAAO e LAAO de outras serpentes. Resíduos de 1 a 192 dos 498 totais.

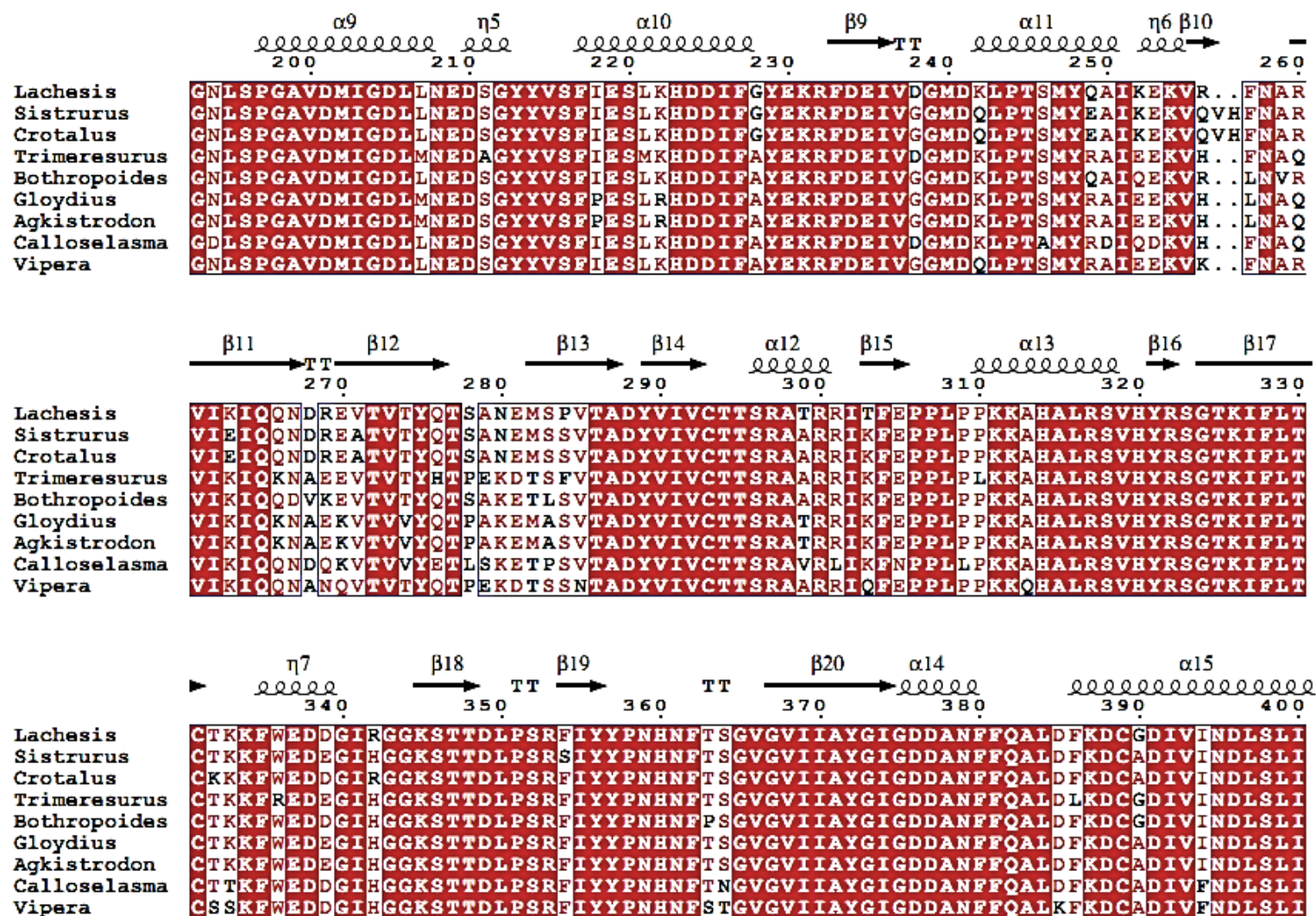


Figura 52b. Alinhamento múltiplo realizado no MultAlin entre LmLAAO e LAAO de outras serpentes. Resíduos de 193 a 400 dos 498 totais.

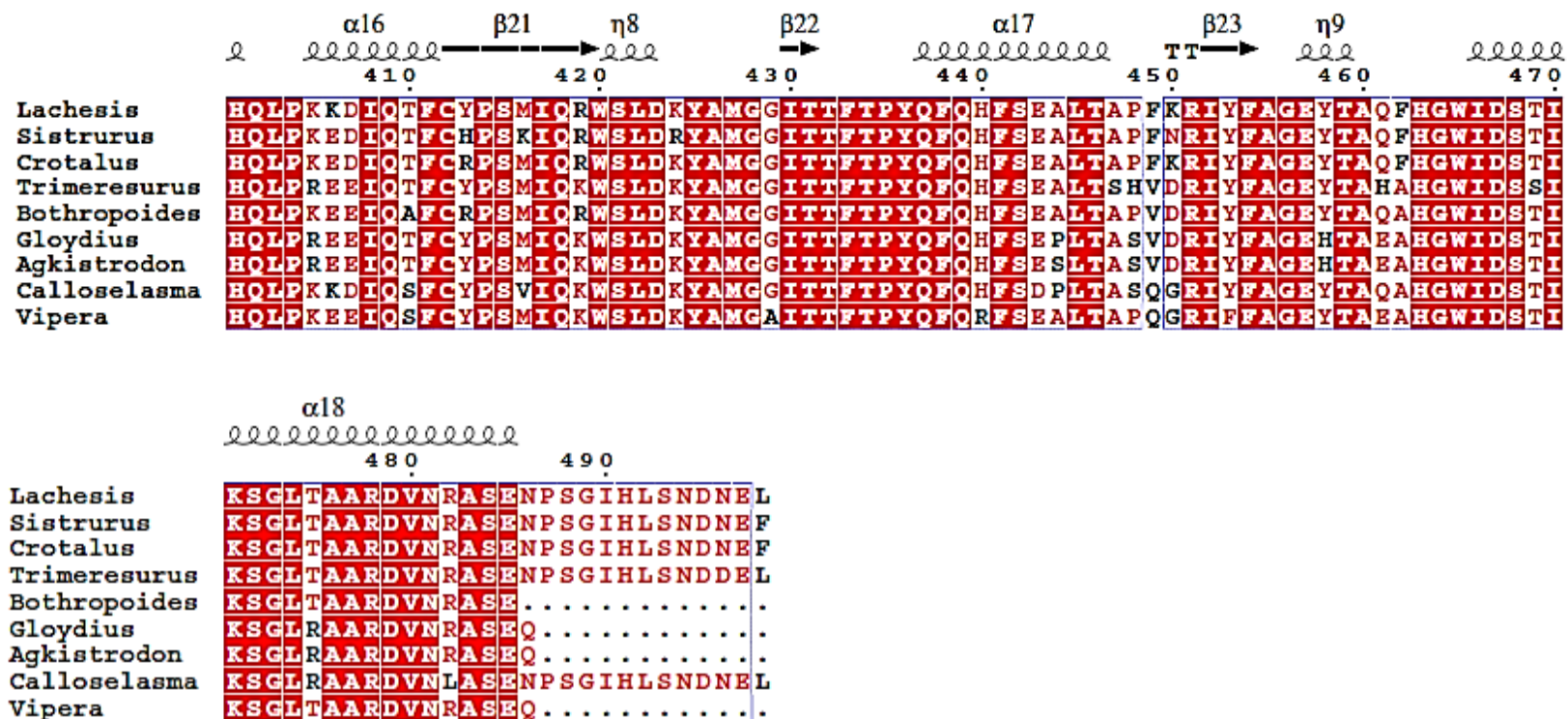


Figura52c: Alinhamento múltiplo realizado pelo programa MultAlin entre LmLAAO e LAAO de outras serpentes. Resíduos de 401 aos 498 totais.

A alta identidade compartilhada entre as sequências primárias das LAAOs de *Agkistrodon halys pallas* e de *Lachesis muta spp* nos permitiu prever a estrutura terciária da forma monomérica da LAAO de *L. muta* (Figura 53).

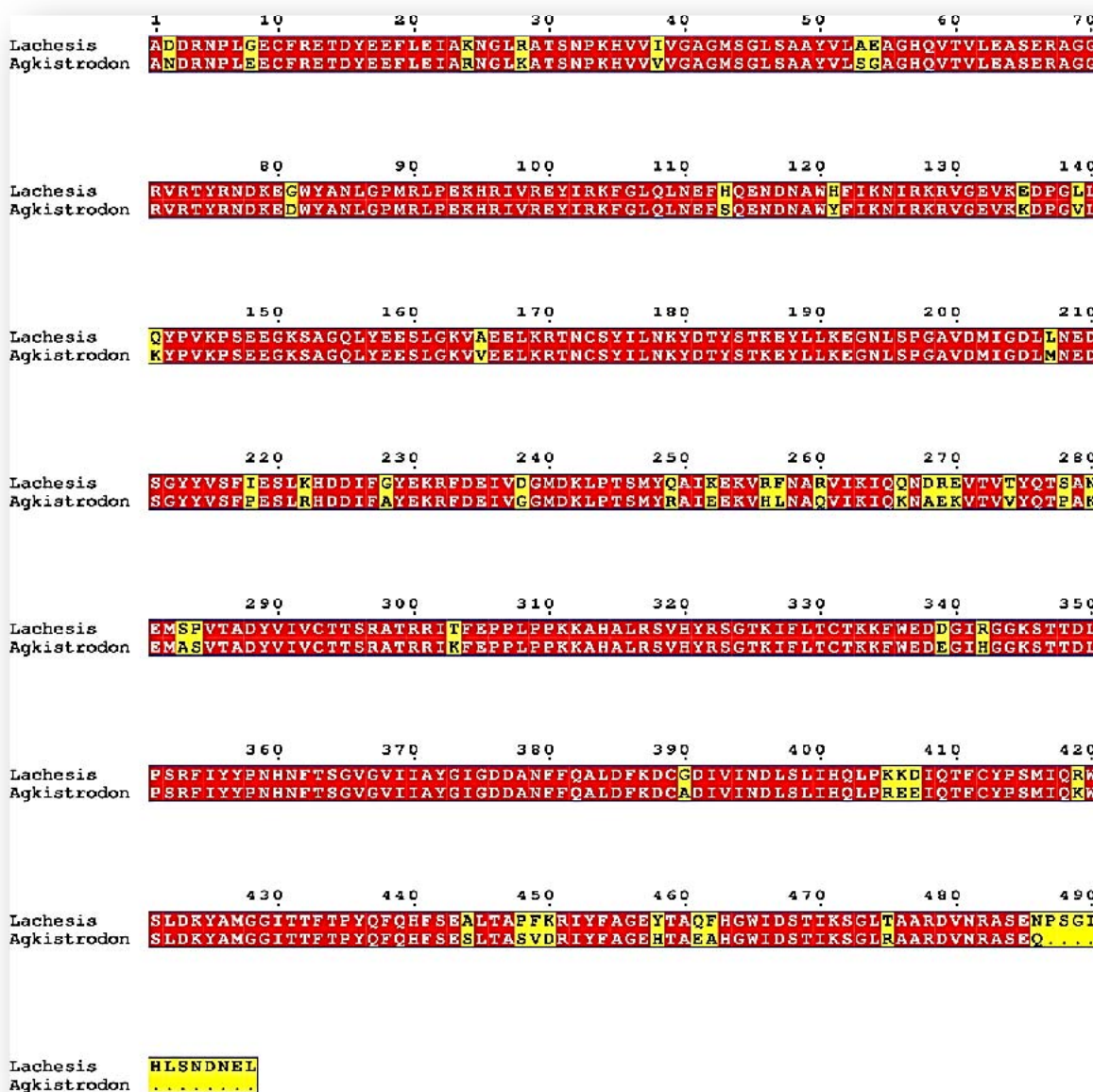


Figura 53. Alinhamento sequencial de LmLAAO (*Lachesis*) com LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (*Agkistrodon*). Com base neste alinhamento entre LmLAAO (*Lachesis*) com LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (*Agkistrodon*) foi construído o modelo molecular.

O modelo final consiste de 486 aminoácidos em cadeia e possui uma molécula do cofator FAD. Análise do plote de Ramachandran revelou que 95,9% resíduos estão em posições favorecidas, 3,1% em parcialmente favorecidas, e 1,0% nas regiões não favorecidas. A estrutura geral de LAAOs de peçonha de serpente consiste em

três domínios: um domínio de ligação do cofator FAD, o domínio de ligação do substrato e o domínio α -hélice (Figura 54). O cofator FAD é encontrado dentro de uma cavidade formada entre o domínio de ligação do cofator e o domínio de ligação do substrato (Figura 55). Já foi descrito que o sítio glicosilação está sobre o resíduo Asn172 (GEORGIEVA et al., 2011 PAWELEK et al., 2000) e está localizado de forma exposta no domínio α -hélice (Figura 54).

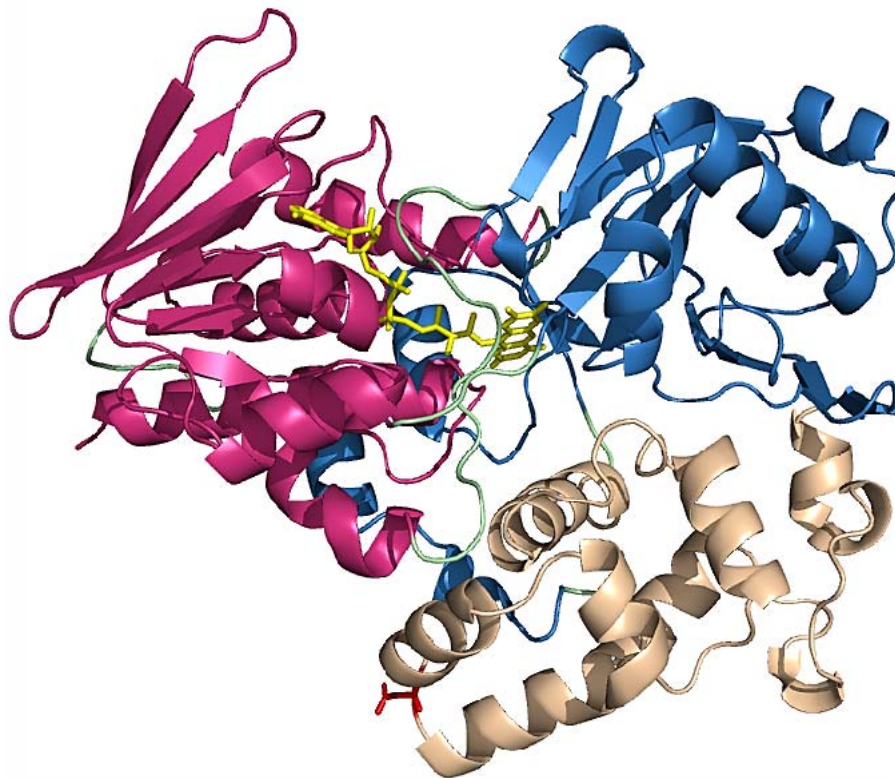


Figura 54. Estrutura tridimensional de LmLAAO. Em detalhe, o domínio de ligação do cofator FAD (rosa), o domínio de ligação do substrato (azul) e o domínio α -hélice (rosa pastel). Molécula de FAD está representada em amarelo e o sítio de glicosilação (Asn 172) é encontrado em vermelho.

Em termos de estrutura geral não existem grandes diferenças quando se compara a estrutura LmLAAO com o molde molecular usado para a modelagem (entrada PDB: 1REO).

Por certo, a comparação estrutural de todas as estruturas cristalinas LAAO disponíveis no Protein Data Bank sugere um alto grau de identidade e similaridade entre as sequências de LAAOs de peçonhas de serpentes. Estas sequências compartilham mais de 80% de identidade e o desvio quadrático médio (Root Mean Standard Deviation RMSD) dos átomos Ca alinhados foi de 0,6 Å.

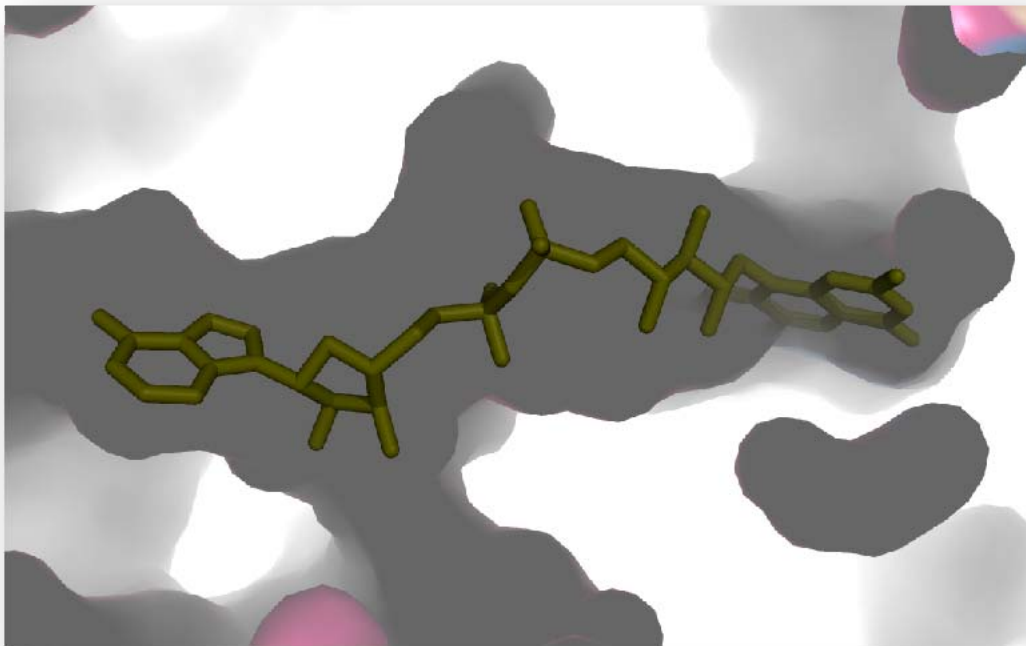


Figura 55. Cavidade do cofator FAD. Esta cavidade é formada entre o domínio de ligação do substrato e o domínio substrato de ligação do cofator FAD.

Ao comparar o modelo previsto para LmLAAO com a estrutura de LAAO *Agkistrodon halys pallas*, descobrimos que os domínios de ligação do cofactor FAD e de ligação substrato, bem como o local de glicosilação (Asn172) são totalmente preservados. A maioria das substituições de aminoácidos estão em locais expostos e espalhados sobre a superfície da enzima (Figura 56 e 57). Estas substituições parecem ser invariáveis ou concordantes com a variação observada entre seqüência LAAOs venenos de serpentes. Tal fato mostra que estas posições específicas podem ser ocupadas por aminoácidos de diferentes propriedades químicas e forma sem alterar a atividade enzimática (Figura 57).

De um total de 49 substituições, apenas 6 posições foram ocupadas por resíduos incomuns quando se considera LAAOs venenos de serpentes: Glu54, His113, Glu135, Gln141, Pro284 e Thr303 (Figuras 52a, 52b, 52c). No entanto, estas substituições pontuais e aleatórias não introduzem quaisquer alterações significativas na distribuição de carga ou volume da estrutura de LmLAAO.

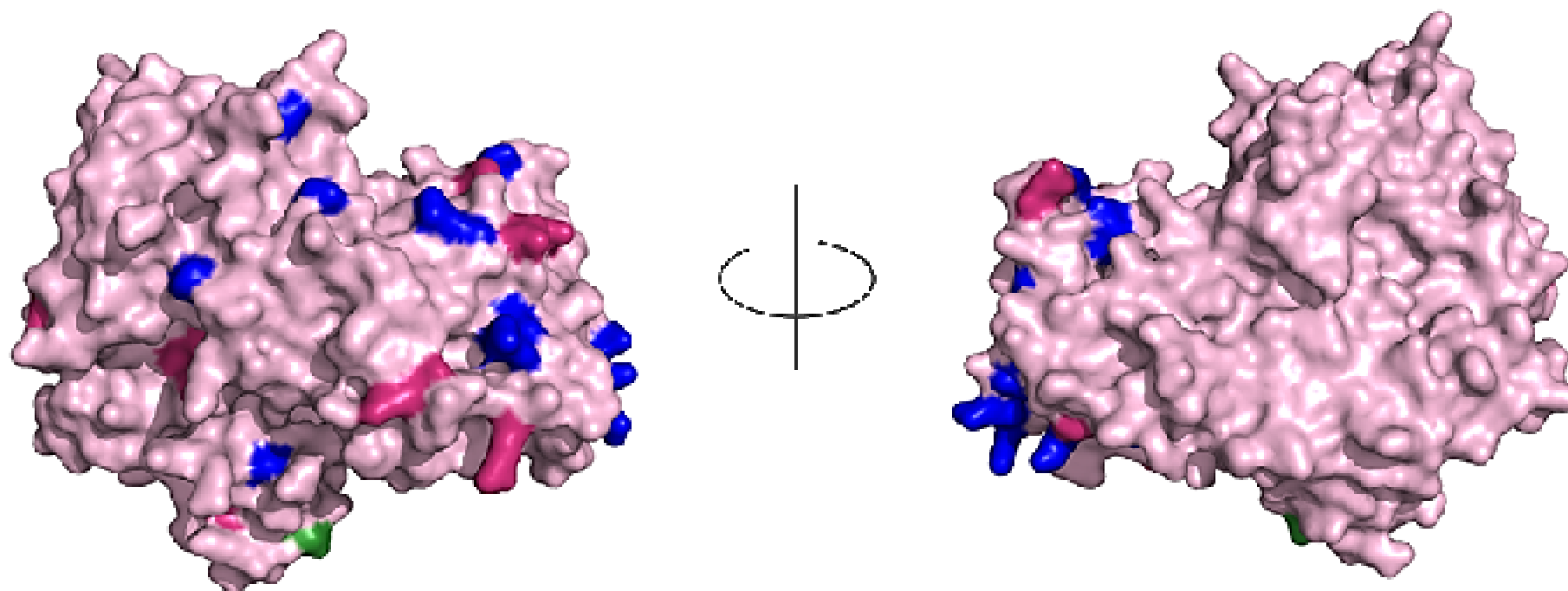


Figura 56. Superfície LmLAAO. As substituições conservadas estão representadas em rosa escuro as substituições não conservadas estão representadas em azul.

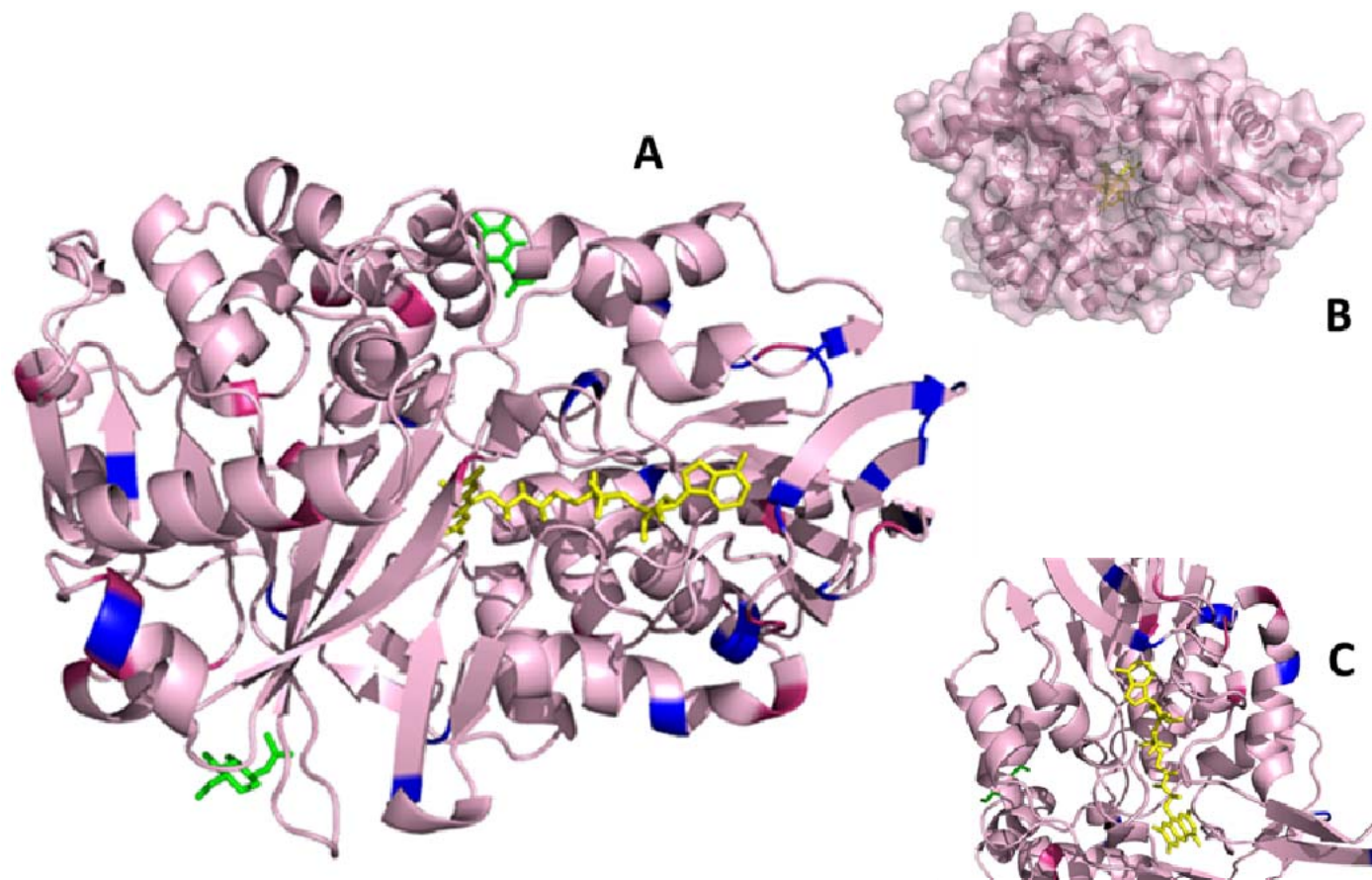


Figura 57. Modelo molecular de LmLAAO construído por modelagem molecular baseado em homologia usando as coordenadas atômicas da LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (PDB 1REO). (A) Estrutura terciária de LmLAAO com destaque para mutações conservadas em cor rosa escuro, e mutações não conservadas em azul. Em amarelo, o cofator FAD; em verde, sítios de glicosilação. (B) Estutura integral de LmLAAO, destacado no centro do modelo, o cofator FAD. (C) Sítio de ligação do cofator FAD.

4.7. Determinação da massa molar por espectrometria de massa

A espectrometria de massas é uma técnica importante para determinar a massa de isótopos e, conseqüentemente, a massa de estruturas orgânicas. Para isso, o espectrômetro de massas é um instrumento que submete moléculas ao bombardeamento por um feixe de elétrons o qual converte as moléculas em íons, que serão acelerados em um campo elétrico. Esses íons produzidos são separados de acordo com a sua razão massa/carga (q/m), são contados e geram o espectro de massas, que é um plote da abundância do íon por sua relação massa/carga (q/m). Para a determinação da massa molar de LmLAAO, o tempo de voo foi medido por um analisador no modo refletor. No modo refletor, os íons com a mesma razão massa/carga são focados por um *refletron* e atingem o detector ao mesmo tempo, resultando em uma análise exata. Vale frisar que o valor da massa de cada íon acelerado na espectrometria de massas corresponde a sua verdadeira massa e não a massa adquirida pela contagem da massa atômica dos elementos constituintes da molécula (PAVIA et al., 2001). Para o preparo da amostra com LmLAAO foi usado como matriz, o ácido ciano 4 hidroxicinâmico ou ácido sinapínico, o qual absorve radiação laser e ionizando-se, protona os peptídeos da proteína a ser analisada.

Em espectrometria de massas a LmLAAO apresentou uma massa molar de 60.852,4 Da, como mostrado na Figura 58.

Foi encontrada uma diferença entre a massa molar encontrada por espectrometria de massas e a massa molar obtida pela análise *in silico* com a sequência deduzida por cDNA. Na análise *in silico*, a massa molar obtida foi de 56.538,7 Da, ou seja, uma diferença de 4.313,7 Da. Macheroux et al. (1999) mostraram em seus trabalhos que LAAOs podem apresentar até 3700 Da de glicosilação e essa massa molar não é computada em predições teóricas como as feitas pelo ProtParam (a Figura 59 mostra a estrutura de um dodecassacarídeo encontrado nas N-glicosilações de LAAO de *Caloselasma rhodostoma*). Além do mais, são previstos erros de 0,1 a 0,2% inerentes à técnica na determinação de massa molar por espectrometria de massas, mostrando que mesmo que seja uma faixa de erro muito pequena, quanto maior o valor da massa molar da proteína a ser analisada, maior seria o erro absoluto. A LmLAAO apresentou massa molar muito parecida com a massa molar de LAAO de *Agkistrodon halys pallas* (60700Da) (ZHANG et al., 2004) e com a massa molar de LAAO de *Vipera libertina* (60900Da) (TÕNISMAG et al., 2006).

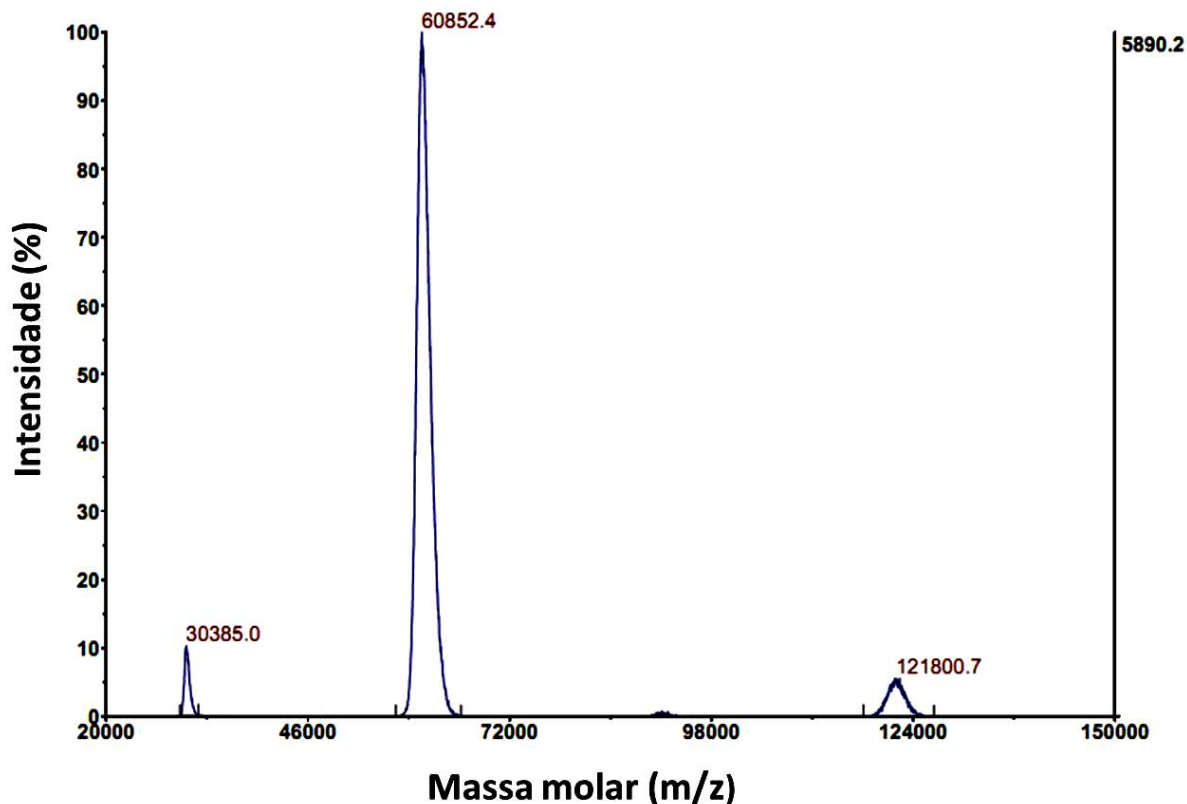


Figura 58. Espectro de massas da LmLAAO. O tempo de voo foi medido por um analisador no modo refletor. Foi usado como matriz, o ácido ciano 4 hidroxicinâmico ou ácido sinapínico.

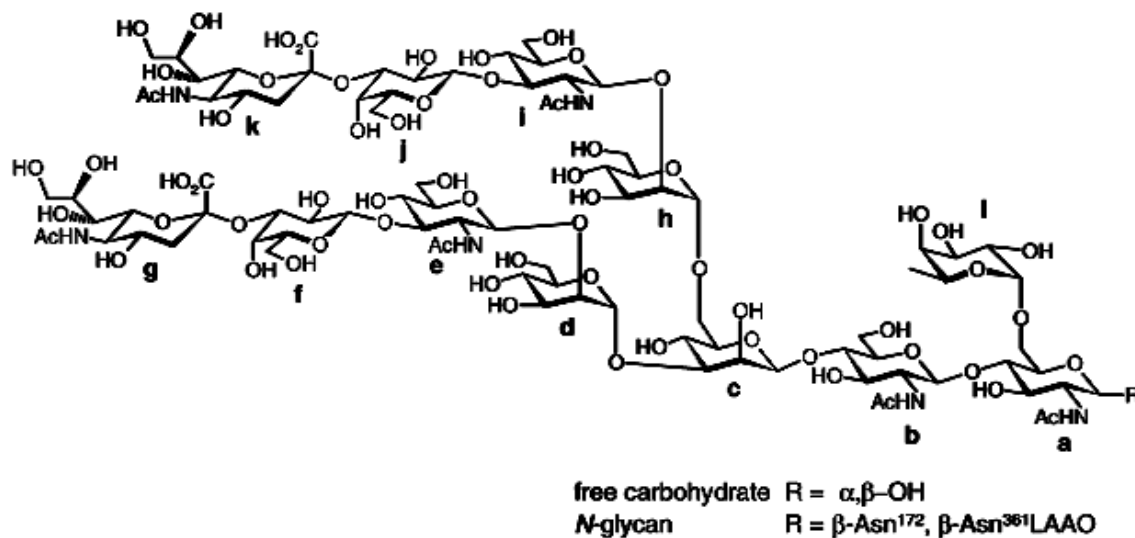


Figura 59. Estrutura química do grupo dodecassacarídeo ligado a LAAO de *Caloselasma rhodostoma* deduzido por espectrometria de ressonância magnética nuclear e espectrometria de massas (GEYER, et al. 2001).

Este ensaio foi feito em parceria com o Dr. Bruno Lomonte do Instituto Clodomiro Picado – Universidad de Costa Rica.

4.8. Determinação do ponto isoelétrico (pI)

Entre os mais importantes aspectos da caracterização bioquímica de uma enzima está a determinação do seu ponto isoelétrico, o pH no qual existe um equilíbrio entre o número de cargas positivas e negativas dos resíduos de aminoácidos que a compõe. Em pHs diferentes do qual a enzima atinge o seu pI, a carga total da enzima pode apresentar-se positiva ou negativa, fato que pode alterar a maneira de sua interação com o meio aquoso. Estas cargas residuais podem também, alterar a interação entre as próprias moléculas da enzima gerando um estado de repulsão entre elas, aumentando a interação com o solvente e, conseqüentemente, favorecendo sua solubilidade.

Em duas corridas distintas de eletrofocalização, obteve-se para LmLAAO o valor de 5,1 para o seu ponto isoelétrico, como indicado na Figura 60.

O valor de pI encontrado experimentalmente (5,1) não corresponde ao valor encontrado por parâmetros teóricos computados pelo software Protparam (6,28). O pI teórico (6,28), é calculado pelo valor dos pKas de cada aminoácido e difere do pI encontrado experimentalmente, pois não considera nenhuma organização dos aminoácidos em estrutura terciária ou quaternária. Valores de pI próximos a 5 também foram encontrados para LAAOs de outras serpentes. Para LAAO de *B. pirajai* o valor encontrado foi de 4,9 (IZIDORO et al., 2006) e para a LAAO de *B. atrox* foi encontrado o valor de 4,4. (MELO et al., 2008).

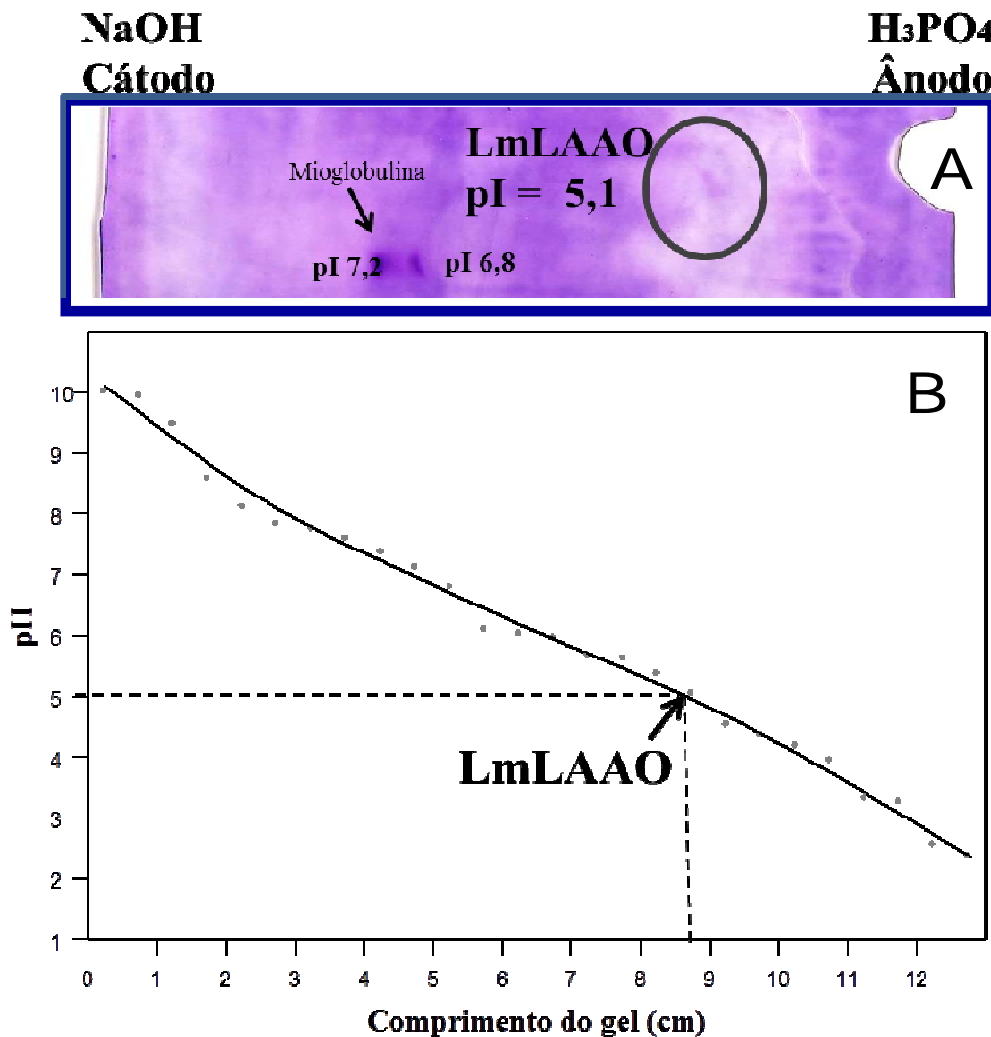


Figura 60. Focalização isoeétrica da LmLAAO em gel de poliacrilamida a 5%. (A) Gel com anfólitos na faixa de pH de 3 a 10. A LmLAAO apresentou pI de 5,1. **(B)** Gráfico do gradiente de pH do gel utilizado para a determinação do pI da LmLAAO. **Amostras de 5 μ L**, Corrida de 4 horas, 2501 V, 140 μ A; 35 W. Gel corado com solução de Coomassie Brilliant Blue G-250 em solução de água/metanol 1:1 (v/v). Padrões de pI utilizados: Mioglobulina (pI 6,8 e 7,2).

4.9. Atividades Farmacológicas

4.9.1. Atividades *in vivo*

Todos os ensaios *in vivo* foram realizados em parceria com o Dr. José Maria Gutiérrez do Instituto Clodomiro Picado – Universidad de Costa Rica. É importante frisar que a LmLAAO empregada nos ensaios *in vivo* é proveniente da mesma amostra que depois seria cromatografada em fase reversa para espectrometria de massas, a qual apresentou elevada

pureza. Esta informação é relevante, pois garante que os resultados obtidos nestes ensaios são devidos à ação da LmLAAO e não de contaminantes de outras classes de toxinas da peçonha.

Atividade Hemorrágica

A injeção intradermal de 50 µg de LmLAAO na região abdominal de camundongos não causou hemorragia. Stábéli et al. (2004) relatam que também não foi observada hemorragia quando doses menores que 100 µg de LAAO de *B. alternatus* foram injetadas em camundongos. O mesmo resultado foi relatado também por Ali, et al. (2000) com LAAO de *Eristocophis macmahoni*.

Indução de Edema.

Recebe o nome de edema o acúmulo de líquido no espaço intersticial do organismo (BOGLIOLO, 2009) e é um evento bastante comum em acidentes ofídicos (GUTIÉRREZ e LOMONTE, 1989). Diferentes toxinas de peçonhas de serpentes tem o poder de causar edema inflamatório quando estudadas isoladamente, mas o efeito sinérgico destes componentes da peçonha agrava ainda mais o quadro clínico da patologia do envenenamento (ZYCAR et al., 2010). Ferreira et al., (2009) demonstraram que a peçonha bruta de *Lachesis muta muta* aumenta a permeabilidade microvascular causando edema de pata em camundongos, por mecanismos que envolvem a ativação de mastócitos e pela presença de metabólitos do ácido aracdônico.

Foi relatado em trabalhos de Stábéli et al. (2004) que a LAAO de *Bothrops alternatus* causa edema quando 50 µg de enzima são injetados na pata de camundongos. Também foi relatado edema de pata com a injeção de 5 µg de LAAO de *Bungarus fasciatus* (WEI et al., 2009). Diferentemente de LAAO isolada de *Bothrops alternatus* e de *Bungarus fasciatus*, a LmLAAO não causou edema na pata de camundongos na dose de 10 µg da enzima (Figura 61 - os valores obtidos para espessura da pata injetada com PBS foram descontados dos valores obtidos da espessura da pata injetada com LmLAAO, fornecendo os valores do edema), quando comparado com o controle injetado com PBS ($t = -0,651$, $gl = 46$, $P = 0,518$). A pureza da toxina usada neste experimento foi demonstrada pela presença de banda única em SDS-PAGE (Figura 42) e por cromatografia em fase reversa (Figura 44). A formação de edema em pata de camundongo CD1 depois da injeção de LmLAAO foi medida em diferentes tempos (15, 60, 180 minutos e 24 horas) e a enzima não causou edema em nenhum dos tempos analisados ($F = 0,680$, $gl = 3$, $P = 0,758$). Os valores obtidos para espessura da pata injetada com PBS foram descontados dos valores obtidos da espessura da pata injetada com LmLAAO.

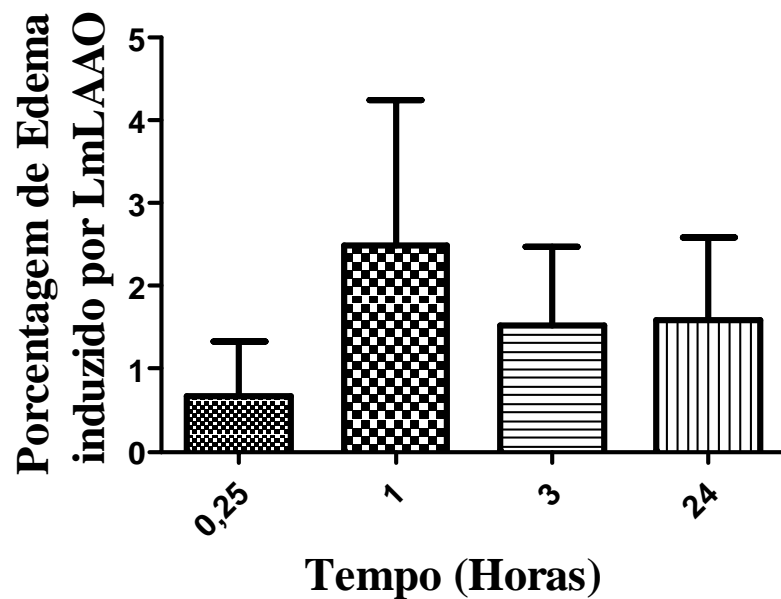


Figura 61. Edema em pata de rato depois da injeção de 10 µg de LmLAAO. As análises foram feitas com paquímetro de relógio nos tempos de 0,25, 1, 3 e 24 horas após a injeção de 10 µg da enzima. Os valores representam a média ± desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

Atividade miotóxica

O termo necrose, usual entre os patologistas, refere-se a processos que culminam com a morte de um determinado grupo de células, acompanhados de autólise. (BOGLIOLO, 2009). Na patologia do envenenamento por serpentes normalmente é observada em diferentes graus a necrose muscular levando até a rbdomiólise (HARRIS e CULLEN, 1990). A degeneração aguda do músculo causa inflamação, edema, além do recrutamento de leucócitos polimorfonucleares e macrófagos (GUTIÉRREZ et al., 1984).

As amostras de tecido muscular de quadríceps de camundongos injetados com 100 µg de LmLAAO mostraram um perfil característico de mionecrose, com hipercontração das miofibrilas (indicado pelas setas na Figura 62-B), hiperemia e migração de leucócitos (Figura 62-B), além do edema inflamatório confirmado pelo exsudato presente no momento de retirada do tecido para ser processado histologicamente. É importante salientar que este ensaio foi realizado com uma dose 10 vezes maior que a utilizada no ensaio de edema em pata de rato (Figura 61). Na fotografia tomada do corte histológico com 4 µm de espessura e aumento de 400x em microscopia de luz (Figura 62-B) observa-se também a integridade de um vaso sanguíneo, indicando a que LmLAAO não é uma toxina hemorrágica.

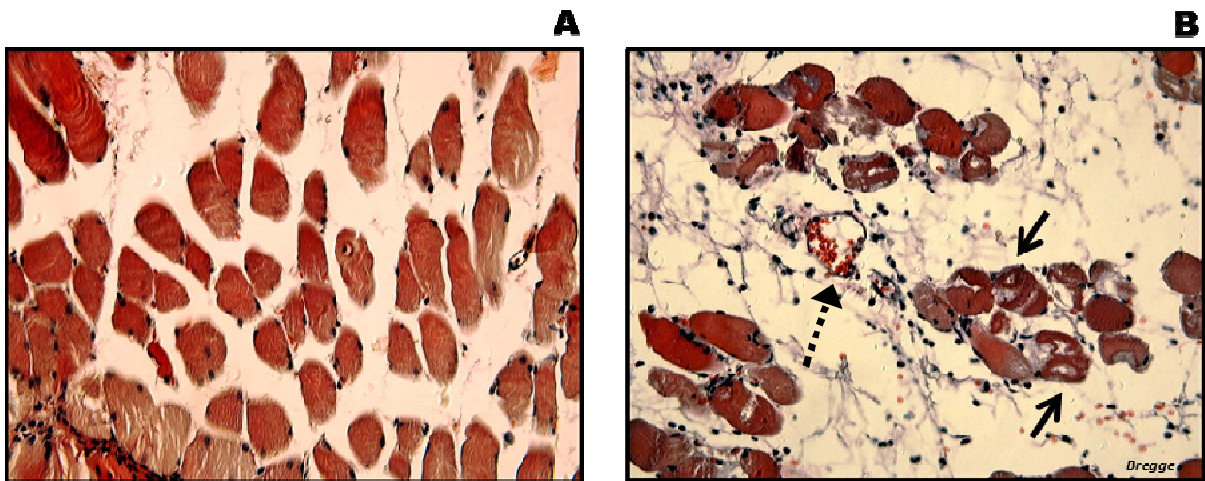


Figura 62. Miotoxicidade *in vivo* causada pela LmLAAO após 3 horas da injeção. Músculos de quadríceps femoral foram fixados e corados com hematoxilina e eosina. Fotos em microscopia de luz, com aumento de 400x. (A) Músculo injetado com 100 μ L de PBS e (B) Músculo injetado com 100 μ g de LmLAAO dissolvidos em 100 μ L de PBS. Em detalhe indicado pela seta contínua, a mionecrose caracterizada pela hipercontração das fibras musculares. Em detalhe indicado pela seta pontilhada, o vaso sanguíneo intacto, mostrando que LmLAAO não é uma toxina hemorrágica.

A mionecrose em acidentes ofídicos pode ser causada por diferentes miotoxinas entre elas as metaloproteases e fosfolipases A_2 (RUCAVADO, 2011; GUTIÉRREZ e CERDAS, 1984). Os mecanismos da mionecrose causada por metaloproteases têm sido exaustivamente estudados e sugere-se que seja um efeito secundário da isquemia causada pela hemorragia e destruição dos capilares sanguíneos (GUTIÉRREZ, 1985). O mecanismo de ação para a mionecrose causada por fosfolipases é diferente do mecanismo de ação da metaloprotease. Sugere-se que a região C-terminal positivada das fosfolipases interage com a região carregada negativamente de receptores de membranas celulares, alterando o controle do influxo de cálcio para dentro das células, culminando com a necrose (LOMONTE et al., 1994, GUTIÉRREZ et al., 1991). As metaloproteases são responsáveis por pelo menos dois processos que culminam com a necrose e ambos são relacionados com a isquemia causada pela destruição de vasos sanguíneos, sendo que no primeiro ocorre a alteração dos capilares causada por modificações nas células endoteliais, e no segundo o rompimento das junções intercelulares (GUTIÉRREZ et al., 2005).

Em trabalhos anteriores foi relatado que a ação tóxica da LAAO é devida à liberação de peróxido de hidrogênio no meio (DU e CLEMETSON, 2002). O efeito miotóxico de LAAO foi estudado por Wei et al. (2009) e, com a injeção de 50 μ g de LAAO de *Bungarus faciatus*, observou-se necrose do tecido muscular.

Para avaliar a ação miotóxica da LmLAAO foram determinados os níveis plasmáticos de creatina-quinase (CK) 3 horas após a injeção de 100 μ g da enzima no músculo quadríceps

de camundongos. Observou-se um aumento de 15 vezes nos níveis de creatina-quinase dos animais injetados com a LmLAAO (2808 U/L), quando comparados com os níveis de CK determinados no plasma de animais controle (170 U/L), injetados com PBS (1U = produção de 1 μ mol de NADH/minuto).

Para confirmar o efeito miotóxico da LmLAAO foram realizados dois experimentos independentes, nos quais usou-se amostras de LmLAAO obtidas de duas purificações distintas, seguindo o *protocolo de purificação 2* (item 4.1.2). Para este estudo, usou-se a prova estatística *U* de Mann Whitney, a qual faz uma comparação de duas medidas independentes. Os resultados de dois experimentos, nos quais camundongos foram injetados com a LmLAAO obtida de duas purificações distintas, são comparados entre si e também com o grupo controle, em que os camundongos são injetados com PBS. Não foi encontrada nenhuma diferença significativa ($U = 12$, $P = 0,917$) entre os ensaios 1 e 2 para a atividade miotóxica da LmLAAO, comprovando que o *protocolo de purificação 2* (item 4.1.2) isolou adequadamente a enzima e que o mesmo apresenta boa reprodutibilidade. Também foi mostrado que a LmLAAO obtida nas duas purificações induziu mionecrose significativa, quando comparada com o grupo controle ($U = -2,745$, $P = 0,006$, para o ensaio 1; $U = -2,739$, $P = 0,006$, para o ensaio 2). Na Figura 63 os valores médios da CK plasmática dos ensaios com a LmLAAO, obtida das duas repetições do protocolo de purificação, foram denominados teste 1 e teste 2.

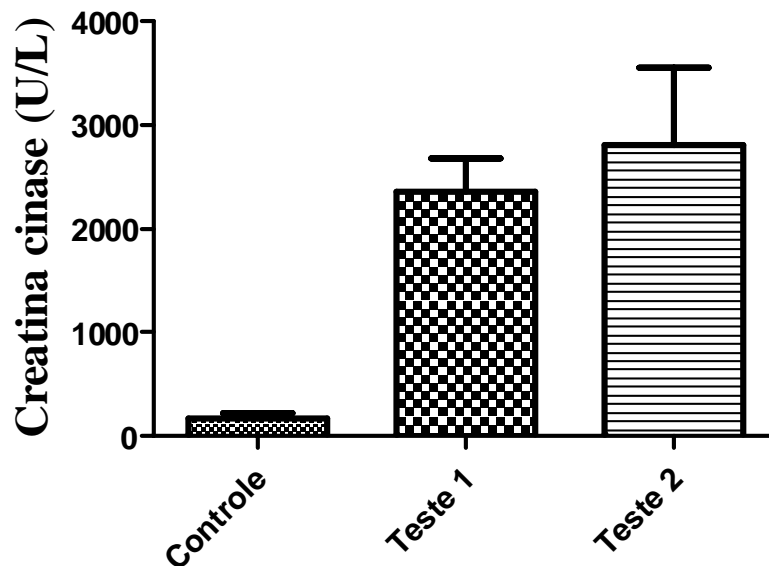


Figura 63. Creatina-quinase plasma de camundongos injetados LmLAAO. Os animais foram injetados no quadríceps femoral com 100 μ g de LmLAAO dispersa em PBS (Teste 1 e Teste 2), ou apenas com PBS (controle). Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

Toxicidade sistêmica

Coração

A insuficiência cardíaca representa um dos problemas causados por envenenamentos por serpentes. Normalmente é devida a paralisia neuromuscular em casos de envenenamento por elapídeos, ou a problemas coagulatórios causados por venenos de viperídeos (AGARWAL et al., 2007). Os efeitos no músculo cardíaco induzidos pela LmLAAO injetada por via intravenosa (i.v.) em camundongos foram avaliados histologicamente e são apresentados na Figura 64. Nenhuma alteração celular foi detectada na magnificação de 400x em microscopia óptica, as fibras musculares permaneceram íntegras e os vasos mantiveram configuração normal.

Cupo et al. (2003) mostraram o não envolvimento da musculatura cardíaca em envenenamentos causados pela peçonha de *Crotalus durissus terrificus*. Dessa forma, é esperado que a peçonha de viperídeos apresente poucos compostos capazes de induzir necrose do tecido cardíaco e a LmLAAO não é uma dessas toxinas.

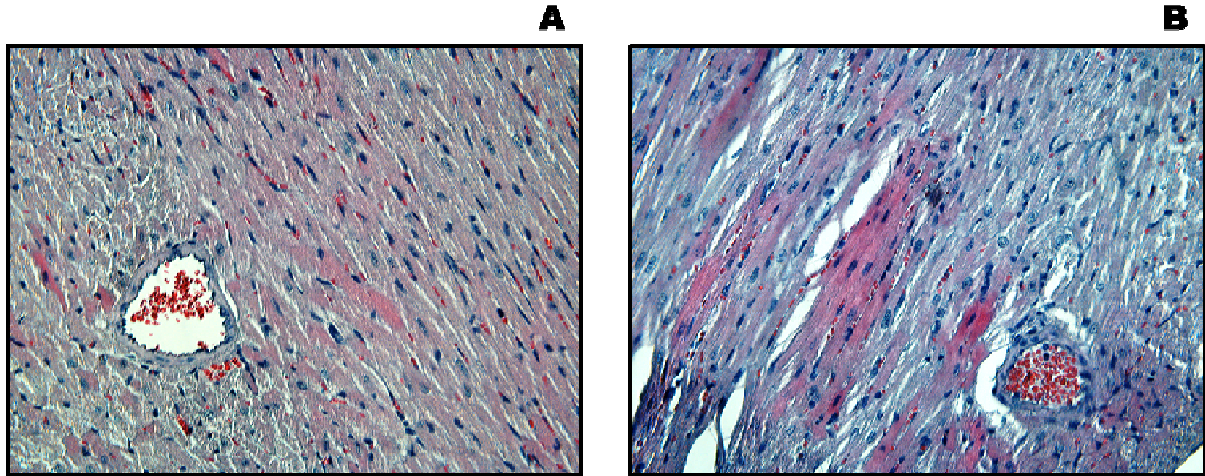


Figura 64. Morfologia do músculo cardíaco de camundongos depois de 3 horas da injeção intravenosa de LmLAAO. Músculo cardíaco fixado e corado com hematoxilina e eosina. Fotos em microscopia de luz, com aumento de 400x. (A) Músculo cardíaco do camundongo injetado i.v. com 100 µL de PBS e (B) Músculo cardíaco do camundongo injetado i.v. com 100 µg de LmLAAO dissolvidos em 100 µL de PBS.

Cupo et al. (2003), estudando os efeitos cardíacos da peçonha de *C. d. terrificus*, também encontraram resultados semelhantes aos obtidos em camundongos injetados com LmLAAO. Embora não tenha sido evidenciada miotoxicidade em músculo cardíaco, os níveis de creatina quinase plasmática aumentaram significativamente com a injeção de LmLAAO, indicando principalmente a mionecrose de músculo esquelético. Esta ação foi confirmada nos

ensaios com músculo quadríceps de camundongos, em que se observa necrose muscular (Figura 62B).

Pulmão

Embora a cardiotoxicidade seja um problema menos proeminente nos casos de envenenamento por serpentes, existem casos em que o agravamento do quadro clínico é devido a edemas pulmonares causados por insuficiência cardíaca (AGARWAL, 2007).

A Figura 65 mostra o tecido de pulmão retirado de um camundongo injetado i.v. com 100 µg de LmLAAO. Comparado com o controle injetado com PBS, a LmLAAO não causou edema pulmonar. Wei et al., (2007) obtiveram resultados diferentes para a LAAO de *Agkistrodon blonhoffi ussurensis*, mostrando em cortes histológicos de pulmão uma grande área com hemorragia.

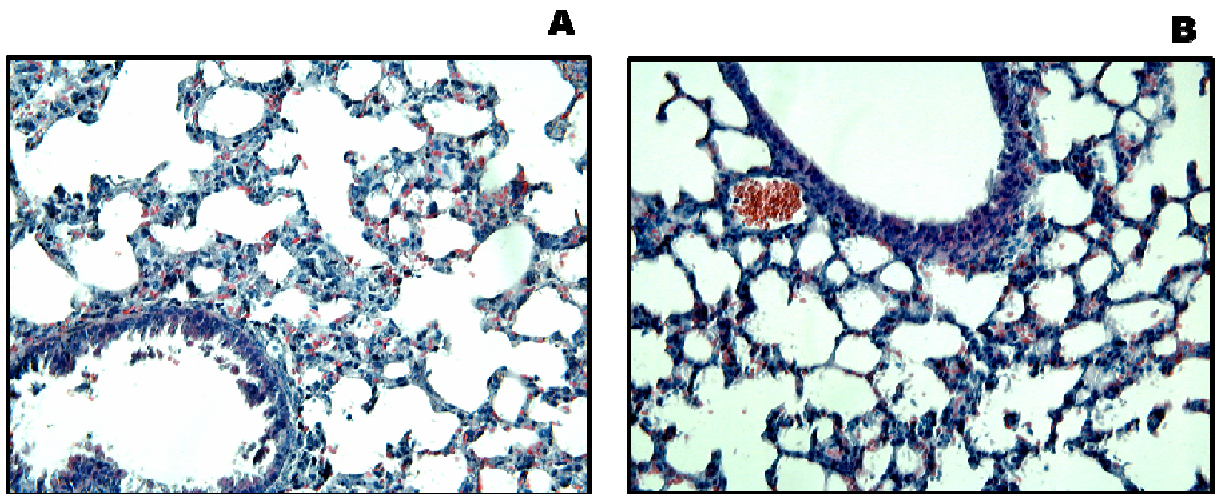


Figura 65 Morfologia do tecido pulmonar de camundongos depois de 3 horas da injeção intravenosa de LmLAAO. Tecido pulmonar fixado e corado com hematoxilina e eosina. Fotos em microscopia de luz, com aumento de 400x. (A) Tecido pulmonar do camundongo injetado i.v. com 100 µL de PBS e (B) Tecido pulmonar do camundongo injetado i.v. com 100 µg de LmLAAO dissolvidos em 100 µL de PBS.

Rim

A disfunção renal é um dos grandes problemas na patologia do envenenamento ofídico. Boer-Lima et al. (1999) estudaram em ratos Wistar degenerações dos túbulos proximais e necrose deste tecido depois de 5 horas da injeção de 0,4 mg/kg de peçonha de *Bothrops moojeni* e encontraram nefrotoxicidade grave tanto em células do túbulo renal quanto do glomérulo. A figura 66 mostra tecido renal retirado de camundongos injetados i.v.

com 100 μg LmLAAO. Observar nas fotos a integridade dos glomérulos, provando que a LmLAAO não causa nefrotoxicidade.

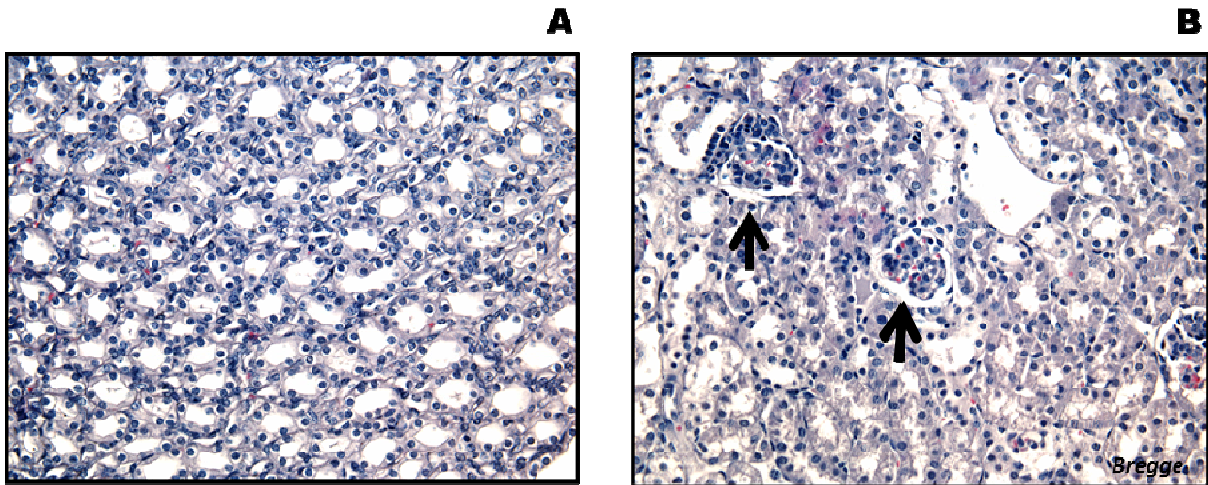


Figura 66. Morfologia dos túbulos renais de camundongos depois de 3 horas da injeção intravenosa de LmLAAO. Microscopia de luz e aumento de 400x em corte de 4 μm do tecido renal corado com hematoxilina e eosina. (A) Tecido renal de camundongo CD-1 injetado i.v. com PBS, (B) Tecido renal de camundongo CD-1 injetado i.v. com 100 μg de LmLAAO. Em (B) detalhe da cápsula renal (indicada pela seta).

4.9.2. Atividades *in vitro*

Citotoxicidade da LmLAAO em células de carcinoma

Linhagem AGS

A Figura 67 mostra a citotoxicidade concentração-dependente de LmLAAO quando adicionada em meio de cultivo celular contendo a linhagem de tumor de estômago AGS. Este ensaio foi feito em parceria com a Dra. Cecília Diaz do Instituto Clodomiro Picado – Universidad de Costa Rica.

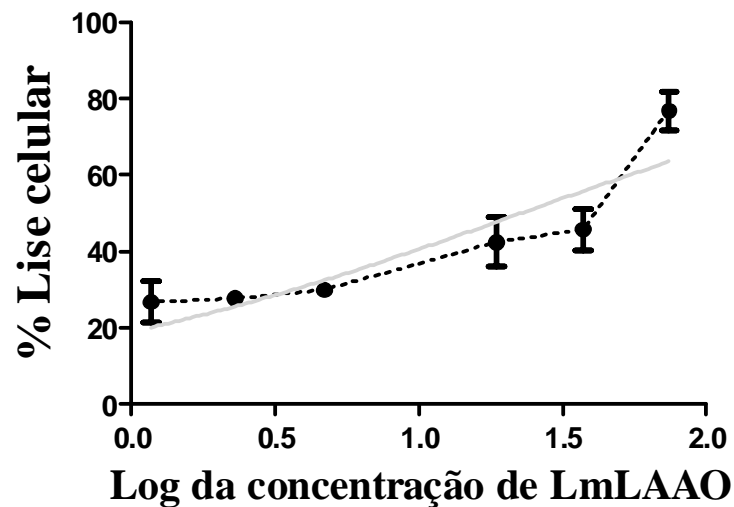


Figura 67. Atividade citotóxica de LmLAAO sobre linhagem de carcinoma estomacal AGS. A toxicidade de LmLAAO sobre esta linhagem mostrou-se concentração dependente, com IC_{50} de $22,70 \mu\text{g/mL} \pm 0,1290$ (Intervalo de confiança 95%, de $11,59 \mu\text{g/mL}$ a $44,45 \mu\text{g/mL}$), resultados expressos em porcentagem de lise celular. Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

A concentração inibitória 50% (IC_{50}) de LmLAAO para essa linhagem foi determinada por software *Graphpad Prism 5*, sendo de $22,70 \mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95%, IC_{50} $11,59 \mu\text{g/mL}$ e $44,45 \mu\text{g/mL}$). A atividade citotóxica de LmLAAO é devida principalmente à liberação de peróxido de hidrogênio no meio, dado que, na presença de catalase e LmLAAO, as células desenvolveram-se como as do controle negativo (resultados não apresentados).

Linhagem MCF-7

A linhagem celular MCF-7 é proveniente de câncer de mama e foi originalmente isolada em 1970. Hoje é amplamente utilizada como modelo de carcinoma de mama (MCF-7, 2011). Este ensaio foi feito em parceria com a Dra. Cecília Diaz do Instituto Clodomiro Picado – Universidad de Costa Rica.

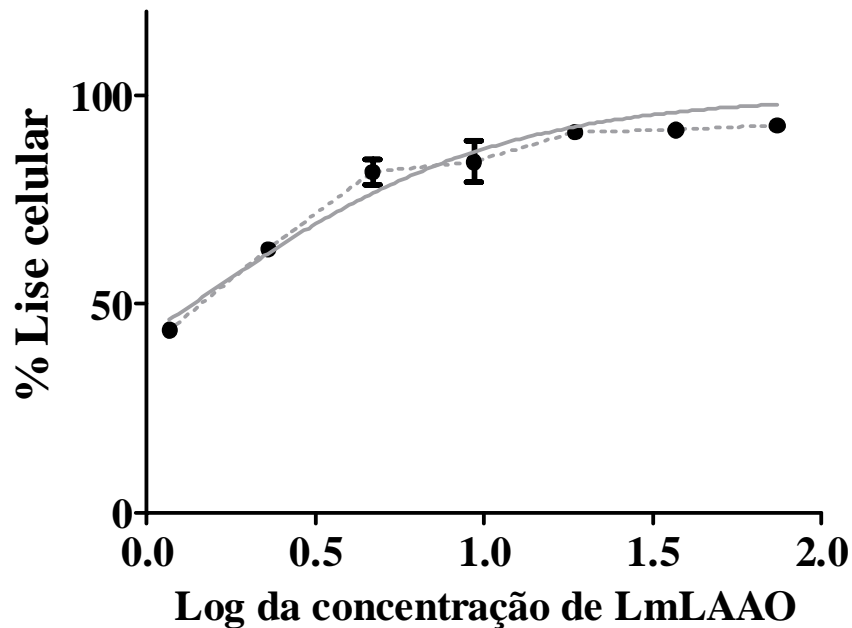


Figura 68. Atividade citotóxica de LmLAAO sobre linhagem de carcinoma mama MCF-7. A toxicidade de LmLAAO sobre esta linhagem mostrou-se concentração dependente, com IC_{50} de $1,41 \mu\text{g/mL} \pm 0,03468$ (intervalo de confiança de 95% de $1,188 \mu\text{g/mL}$ a $1,689 \mu\text{g/mL}$), resultados expressos em porcentagem de lise celular. Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

A concentração inibitória 50% (IC_{50}) de LmLAAO (Figura 64) para a linhagem MCF-7 foi determinada por software *Graphpad Prism 5*, sendo $1,41 \mu\text{g/mL}$ ($\text{Log } IC_{50}$ $0,1513$, desvio padrão $0,03468$; com intervalo de confiança de 95%, $\text{Log } IC_{50}$ deve estar entre $0,07492$ e $0,2276$; e a IC_{50} deve estar entre $1,188$ to $1,689$). A presença de catalase na concentração de $0,1 \text{ mg/mL}$ inibiu a ação tóxica de LmLAAO sobre a linhagem AGS.

A capacidade das LAAOs em causar citotoxicidade em linhagem de células de tumor tem sido estudada por outros autores. Alves et al. (2008) estudaram o efeito de LAAO de *B. atrox* em diferentes células, encontrando mesmo valor de IC_{50} ($25 \mu\text{g/mL}$) para as linhagens PC12 (medula adrenal), B16F10 (melanona) e Jurkat (leucemia). Estas linhagens tem uma suscetibilidade parecida com linhagem de carcinoma estomacal AGS usada neste trabalho (IC_{50} $22,70 \mu\text{g/mL} \pm 0,1290$). Souza et al. (1999) também estudaram fragmentação nuclear de células da linhagem HL60 (leucemia promielocítica), encontrando IC_{50} igual a $25 \mu\text{g/mL}$. Existem outras linhagens que são mais susceptíveis, como Hela (câncer cervical). Esta linhagem foi estudada quanto a suscetibilidade frente LAAO de *Agkistrodon halys pallas* e com uma dose de $0,5 \mu\text{g/mL}$, o crescimento foi inibido (ZHANG et al. 2004).

Citotoxicidade da LmLAAO em Parasitas

Formas promastigotas de Leishmania braziliensis

A Figura 69 mostra a dependência da dose de LmLAAO sobre a porcentagem de lise celular da forma promastigota de *Leishmania braziliensis*. Este ensaio foi feito em parceria com o Dr. Sergio de Albuquerque da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

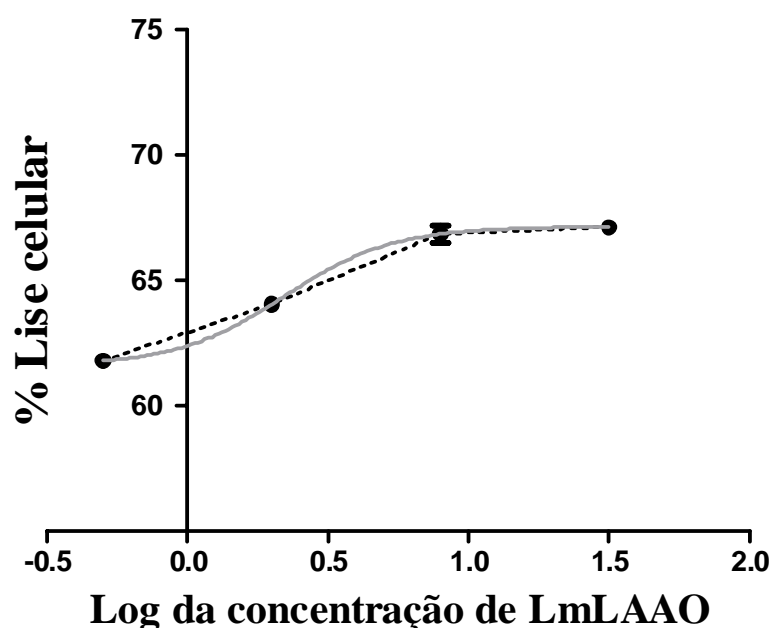


Figura 69. Atividade citotóxica de LmLAAO sobre a forma promastigota de *Leishmania braziliensis*. A toxicidade de LmLAAO sobre esta linhagem mostrou-se concentração dependente, com IC_{50} de 2,22 $\mu\text{g/mL}$ (intervalo de confiança de 95% 1,921 $\mu\text{g/mL}$ a 2,569 $\mu\text{g/mL}$). Os resultados expressos em porcentagem de lise celular Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

A dose inibitória 50% (IC_{50}) de LmLAAO para a linhagem de *Leishmania braziliensis* foi determinada por software *Graphpad Prism 5*, sendo 2,22 $\mu\text{g/mL}$ ($\text{Log } IC_{50}$ 0,3466, desvio padrão 0,02272; com intervalo de confiança de 95%, $\text{Log } IC_{50}$ deve estar entre 0,2836 e 0,4097; e a IC_{50} deve estar entre 1,921 to 2,569). A presença de catalase inibiu totalmente a atividade L-aminoácido-oxidase, indicando que o efeito da LmLAAO é consequência da liberação de H_2O_2 .

Foi necessária a dose de 1,44 $\mu\text{g/mL}$ de LAAO de *B. moojeni* para a citotoxicidade da forma promastigota de *L. braziliensis* (TEMPONE et al., 2001). A presença de catalase na

concentração de 0,1 mg/mL promoveu um crescimento dos parasitas igual ao controle negativo, efeito igual ao observado nos nossos estudos.

Formas tripomastigotas de T. cruzi

A Figura 70 mostra a dependência da dose de LmLAAO sobre a porcentagem de lise celular da forma tripomastigota de *Trypanosoma cruzi* da linhagem Brener. Este ensaio também foi realizado em parceria com o Dr. Sergio de Albuquerque da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo.

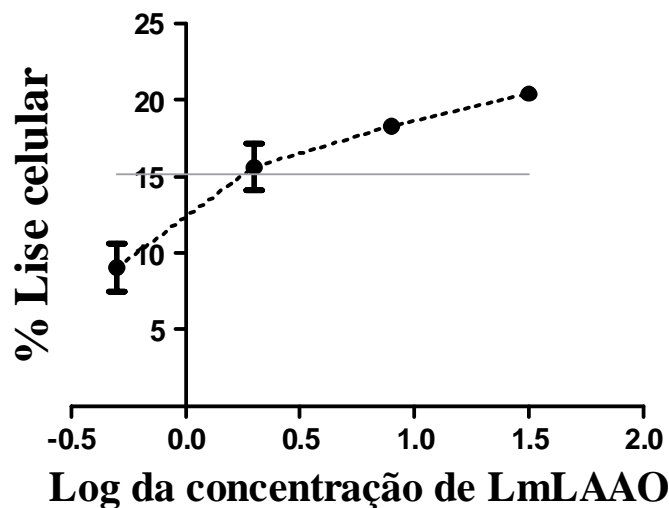


Figura 70. Atividade citotóxica de LmLAAO sobre a forma tripomastigotas da linhagem Brener de *Trypanosoma cruzi*. Os resultados são expressos em porcentagem de lise celular. Os valores representam a média \pm desvio padrão de ensaio realizado em triplicata.

Não foi possível determinar a IC_{50} para a forma tripomastigota de *T. cruzi* da linhagem Brener, dado que com a maior dose testada (32 μ g/mL) foi constatada uma porcentagem de lise de apenas 20%, bem distante da porcentagem de 50%. Para este ensaio torna-se inviável a adição de doses acima de 32 μ g/mL de LmLAAO, e conclui-se que esta cepa de *T. cruzi* é, de certa forma, resistente à ação citotóxica de LmLAAO. Esta refratariedade dos parasitas também foi encontrada para diferentes doses de LAAO de *B. atrox*, dado que uma dose de 32 μ Mol/L foi necessária para matar apenas 41,7% \pm 2,4 dos tripomastigotas (de Melo Alves Paiva, et al. 2011).

5. Conclusões

Este trabalho mostrou o desenvolvimento de dois protocolos de purificação da LmLAAO. Tal estudo é de grande importância para a pesquisa, sendo que a versatilidade e o aproveitamento dos recursos de um laboratório é de grande valia e promove a geração de dados que enriquecem o conhecimento nas diferentes áreas.

A pureza de LmLAAO ao final de cada protocolo de purificação foi comprovada pela presença de banda única em SDS-PAGE. Além da pureza, LmLAAO apresentou-se ativa ao final de cada um dos protocolos de purificação.

Os estudos de funcionalidade depois de incubação em diferentes pHs e temperaturas enriquecem o conhecimento da sua atividade catalítica, bem como a melhor forma de purificá-la ou armazená-la. LmLAAO mostrou preferência catalítica para L-aminoácidos hidrofóbicos, como já tinha sido mostrado em literatura para LAAOs de diferentes organismos. Além disso, LmLAAO é desnaturada quando em pH 10, e a temperatura de 100°C, comportamento esperado em uma enzima.

O valor relativamente baixo da constante de Michaelis-Menten para o aminoácido L-Leucina corrobora a preferência catalítica de LmLAAO para aminoácidos hidrofóbicos.

A diferença entre o valor de ponto isoelétrico determinado teoricamente em software e o obtido em experimentos de laboratórios é em grande parte explicada pela presença de glicosilações na enzima. Também é pela presença de glicosilações que se explica a diferença entre o valor de massa molar encontrado em software a partir da sequência de cDNA e o valor determinado por espectrometria de massas.

A sequência dos resíduos dos aminoácidos do N-terminal de LmLAAO obtidos por cDNA coincide com o N-terminal determinado pela degradação de Edman, mostrando que trabalhamos com a mesma enzima sempre. Foi também por meio da sequência de resíduos obtidos por cDNA que se verificou a grande identidade de LmLAAO com LAAOs de outras serpentes. O modelo molecular de LmLAAO ajuda a entender o processo tóxico causado pela enzima, já que é possível visualizar os aminoácidos da superfície bem como os resíduos presentes nos sítios catalíticos e de ligação do cofator.

Comparada com outras enzimas ou toxinas presentes na peçonha de serpentes, LmLAAO apresenta uma toxicidade baixa *in vivo*, mostrada pela ausência de edema de pata quando injetada em camundongos, bem como pela ausência de toxicidade sistêmica. Porém pode ser uma ferramenta citotóxica para agentes patológicos, fato verificado pela toxicidade *in vitro* para *Leishmania sp*.

6. Referências

AGARWAL, R.; SINGH, A.P.; AGGARWAL, A.N. Pulmonary oedema complicating snake bite due to *Bungarus caeruleus*. **Singapore Med J.** v.48 (8) p. 227-320, 2007.

AGUIAR, A.S. et al. Purification and partial characterization of a thrombin-like/gyroxin enzyme from bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) venom. **Toxicon**, v.34, n.5, p. 555-565, 1996.

AHN, M.Y.; LEE, B.M.; KIM, Y.S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **Int J Biochem Cell Biol.** v.29(6), p.911-919, 1997.

AKAO, P.K.; et al. Structural studies of BmooMPalpha-I, a non-hemorrhagic metalloproteinase from Bothrops moojeni venom. **Toxicon.** Feb-Mar;55(2-3):361-8. 2010.

ALI, S. A. et al. Isolation, structural, and functional characterization of an apoptosis-inducing L-amino acid oxidase from Leaf-Nosed viper (*Eristocophis macmahoni*) Snake Venom. **Arch. of Biochem. Bioph.** v. 384 (2), p. 216-226, 2000.

ALTSCHUL, S.F.; et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs. **Nucleic Acids Res.**, v.25, p.3389-3402, 1997.

ALVES, R.M. et al. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by l-amino acid oxidase isolated from Bothrops atrox snake venom. **Comp Biochem Physiol A Mol Integr Physiol.** v.151(4) p.542-550, 2008.

ANDE, S.R.; et al. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Yeast** v.25 p. 349–357, 2008.

ARANTES, E.C. et al. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v.1199, p.69-75, 1994.

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

ASHKENAZI, A. Targeting the extrinsic apoptosis pathway in cancer. **Cytokine and Growth Factor Reviews.** v.19(3-4), p.325–331, 2008.

BARBIÉRI, C. L. et al. Glycosphingolipid antigens of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* amastigotes identified by use of a monoclonal antibody. **Infect Immun.** v.61(5) p.2131-2137, 1993.

BARRANCO, S. C. et al. Heterogeneous responses of an in vitro model of human stomach cancer to anticancer drugs. **Invest. New Drugs** v.1 p.117-127, 1983.

BARRAVIERA, B. Acidentes por Serpentes do Genero *Crotalus* e *Micrurus*. In: --- **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas. Cap 20, 1994, p.281-295.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por Serpentes do Genero *Bothrops*. In: --- **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas. Cap 19, 1994, p.261-280.

BARROS, L. C. et al. A new fibrin sealant from *Crotalus durissus terrificus* venom: applications in medicine. **Journal of toxicology and environmental health. Part B, Critical reviews** v.12(8) p.553-71, 2009.

BDOLAH, A. The venom glands of snakes and venom secretion. In: ----- LEE,C.Y. **Snake venom**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979. p. 41-57.

BEETON, C. et al. Selective blockade of T lymphocyte K⁺ channels ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis, a model for multiple sclerosis. **Proc. Natl Acad. Sci.**, v. 98, p. 13942–13947, 2001.

BEETON, C. et al. A novel fluorescent toxin to detect and investigate Kv1.3 channel up-regulation in chronically activated T lymphocytes. **J. Biol. Chem.**, v. 278, p. 9928–9937, 2003.

BERNARDI, P. S. M.; MOREIRA, H. W. Análise dos traçados de ondas da agregação plaquetária em pacientes com doenças cardiovasculares em uso de ácido acetilsalicílico comparados a doadores de sangue. *Revista brasileira de hematologia e hemoterapia*. V.26(4)239-244, 2004.

BÉRNILS, R. S. (org.). **Brazilian reptiles**: List of species (2010). Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>> Sociedade Brasileira de Herpetologia. Acesso 03 ago.2011.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinase from snake venoms. **Pharmacol.Ther.**, v.62,n.3 p.325-372, 1994.

BOER-LIMA P. A.; GONTIJO, J. A., DA CRUZ-HÖFLING, M. A. Histologic and functional renal alterations caused by *Bothrops moojeni* snake venom in rats. **Am J Trop Med Hyg.** v. 61 p.698-706, 1999.

- BLOOM, A. L.; DAVIES, A. J. Adenosine diphosphate and the measurement of platelet adhesiveness. **Journal of clinical pathology**. v. 20(5) p.706-707, 1967.
- BOGLIOLO, L. Bogliolo, patologia geral/editado por Brasileiro-Filho. 4ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2009.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Doenças infecciosas e parasitárias**: Guia de bolso. 8.ed. rev. Brasília: Ministério da Saúde, 2010.
- BRUCE, C. et al. Recombinant conotoxin, TxVIA, produced in yeast has insecticidal activity. *Toxicon*, v.30, p.1-8, 2011.
- BUCKNER, F. S. et al. Efficient technique for screening drugs for activity against *Trypanosoma cruzi* using parasites expressing beta-galactosidase. **Antimicrob Agents Chemother**. v.40(11), p.2592-7259,1996.
- BUTANTAN <http://www.butantan.gov.br/materialdidatico/numero5/numero5.htm> . Acesso em 19 de setembro de 2008.
- CADLE, J. E. The geographic distribution of snakes: problems in phylogeny and zoogeography. **Snakes: ecology and evolutionary biology**, p.77-105, 1987.
- CAIRRÃO, M. A. R. et al. *P. bistrriata* and *S.raptor* venoms: inhibitor of GABA uptake and convulsant effect. **Pharm. Biol** v.40, p.472-477, 2002.
- CAMPBELL. J. A.; LAMAR, W. W. The Venomous Reptiles of Latin America. Cornell University Press. Ithaca. NY, 1989.
- CARDOSO, J. L. C. et al . Animais peçonhentos do Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes, São Paulo: Sarvier, 2003.
- CHIRGWIN, J. M. et al. Isolation of biologically active ribonucleic acid from sources enriched in ribonuclease. **Biochemistry** v.18(24), p.5294-9, Nov 27, 1979.
- CHO, J. H.; SUNG, B. H.; KIM, S. C. Buforins: histone H2A-derived antimicrobial peptides from toad stomach. **Biochimica et biophysica acta**. v. 1788(8) p. 1564-1569, 2009.
- CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biol Rev Camb Philos Soc**. v.72 (3) p.365-79, 1997.

COLLINS, C. H.; BRAGA, G. L.; BONATO, P. S. Fundamentos de cromatografia. Campinas: Editora da Unicamp, 2006.

CORPET F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Res.** v.16(22) p.10881-1090, 1988.

CUPO, P.; DE AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E. Absence of myocardial involvement in children victims of *Crotalus durissus terrificus* envenoming. **Toxicon** v.42(7) p.741-745, 2003

CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETA, P. M. D- and L- aminoacid oxidases. In: MULLER, F. (Ed) **Chemistry and biochemistry of flavoenzyme**. V.3 CRC Press Boca Roton FL p. 69-94, 1992.

CURTI, B.; MASSEY, V.; ZMUDKA, M. Inactivation of snake venom L-amino acid oxidase by freezing. **J Biol Chem.** v. 243(9) p.2306-2314, 1968.

DALMORA, S.L.; VACCARI, S.F.; PEREIRA, J.E.S. Dosagem biológica do antiveneno botrópico. **Mem.Inst.Butantan**, v.54,p.21-30, 1992.

DAMICO, D. C. S. et al. Neurotoxic and myotoxic actions from *Lachesis muta muta* (surucucu) whole venom on the mouse and chick nerve-muscle preparations. **Toxicon** v.46, p.222-229, 2005.

DAMICO, D. C. et al. Cytotoxicity of *Lachesis muta muta* snake (bushmaster) venom and its purified basic phospholipase A2 (LmTX-I) in cultured cells. **Toxicon.** v.49(5) p.678-92, 2007.

DE BIN, J.A.; MAGGIO, J.E. e STRICHARTZ, G.R. Purification and characterization of choleroxin, a chloride channel ligand from venom of the scorpion. **American journal of physiology. Cell physiology** v.264, p.C361-C369, 1993.

DE MELO ALVES PAIVA, R. et al. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie.** v.93(5) p.941-947, 2011.

DELGADO, A. V. et al. Measurement and interpretation of electrokinetic phenomena. **Pure Appl. Chem.** v.77 n.10, p.1753-1805, 2005.

DE-SIMONE, S. G.; NETTO, C. C.; SILVA, F. P. Jr. Simple affinity chromatographic procedure to purify beta-galactoside binding lectins. **J. Chromatogr B Analyt Technol Biomed Life Sci.** v.838(2) p.135-138, 2006.

DEOLINDO, P. et al. L-amino acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi*. **Toxicon** 56 (6) p. 944-955, 2010.

DOWLING, H. G.; DUELLMAN, W. E. **Systematic herpetology**: a synopsis of families and higher categories. New York: His Publication, 1978. 50p.

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

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **European Journal of Biochemistry / FEBS** Mar;1(1), p.80-91, 1967.

EMSLEY, P.; COWTAN, K. Coot: model-building tools for molecular graphics. **Acta Crystallography**. v.60, p.2126–2132, 2004.

FERREIRA, T. et al. Inflammatory oedema induced by *Lachesis muta muta* (Surucucu) venom and LmTX-I in the rat paw and dorsal skin. **Toxicon** v. 53 p.69-77, 2009.

FISER, R. K.; SALI, A. Modeling of loops in protein structures, **Protein Science**, v. 9, p. 1753-1773, 2000.

FISZON J. T.; BOCHNER, R. Subnotificação de acidentes por animais peçonhentos registrados pelo SINAN no Estado do Rio de Janeiro no período de 2001 a 2005. **Rev. Bras. Epidemiol.** v. 11(1), p.114-127, 2008.

FONTANA A. C. K. et al. Paralyzing activity of the *Parawixia bistrriata* crude venom in termites: a new bioassay. **Toxicon** v. 38 p.133-138, 2000.

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

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

FRANÇA, F. O., Associação da envenenomia e de gravidade em acidentes botrópicos, no momento da admissão no Hospital Vital Brasil do Instituto Butantã de São Paulo, com variáveis epidemiológicas, clínicas e laboratoriais, **Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 3, p. 187-190, 1998.

FREITAS, et al. O significado da expressão “haplótipo” em estudos populacionais. Um estudo de caso com *Chrysoperla externa* (Hexapoda: Neuroptera: Chrysopidae). **Resumos do 55º Congresso Brasileiro de Genética**, 2009.

FRIEDERICH, C.; TU, A.T. Role of metals in snake venom for hemorrhage, esterase and proteolytic activities. **Biochem. Pharmac.** v.20,p.1549-1556,1971.

FIOCRUZ - FUNDAÇÃO OSWALDO CRUZ. Rio de Janeiro, 2011. Disponível em: <http://www.fiocruz.br/sinitox_novo/media/serpentes.pdf> Acesso em 19 jun. 2011.

FRY, B.G. et al. Early evolution of the venom system in lizards and snakes. **Nature.** v. Feb 2; v.439(7076) p. 584-8, 2006

FULY, A. L et al. Lysophosphatidylcholine produced by the phospholipase A2 isolated from *Lachesis muta* snake venom modulates natural killer activity as a protein kinase C effector. **Toxicon**, v.50 p.400-410, 2007.

FUNASA, (Fundação Nacional de Saúde). Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos. 2ª ed. – Brasília, 120p, 2001.

GE, Y. et al. In Vitro Antibacterial Properties of Pexiganan, an Analog of Magainin. **Antimicrobial Ag. Chem.** v. 43 n.4, p. 782–788, 1999.

GEORGIEVA, D. et al. The structure of a native l-amino acid oxidase, the major component of the *Vipera ammodytes ammodytes* venom, reveals dynamic active site and quaternary structure stabilization by divalent ions. **Mol Biosyst.** v. 7(2) p.379-384, 2011.

GEYER, A. et al. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur J Biochem.** v.268(14) p.4044-4053, 2001.

GOUET, P. et al. ESPript: analysis of multiple sequence alignments in PostScript. **Bioinformatics**, Oxford, v. 15, n. 4, p. 305-308, 1999.

GRAHAM, R. L. et al. Identification and functional analysis of a novel bradykinin inhibitory peptide in the venoms of New World Crotalinae pit vipers. **Biochem Biophys Res Commun.**;v. 338(3): p.1587-1592, 2005.

GUIMARÃES, M. A. Uma proposta de ensino de zoologia baseada na sistemática filogenética, 2010. Disponível em: < <http://pt.scribd.com/doc/4626526/Uma-proposta-de-ensino-de-zoologia-baseada-na-Sistemática-Filogenética>> Acesso em: 06 ago. 2011.

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

GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, J. NÚÑEZ, F. et al. Skeletal muscle necrosis and regeneration after injection of BaH1, a hemorrhagic metalloproteinase isolated from the venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Exp. Mol. Pathol.** v.62, p.28-41, 1995.

GUTIÉRREZ J.M. et al. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of bothropstoxin-II, a phospholipase A2 isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp Mol Pathol.** v.3 p.217-29, 1991.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. **Mem Inst. Butantan.** v.51, p. 211-223, 1989.

GUTIÉRREZ, J.M.; GENÉ, J.A.; ROJAS, G.; CERDAS, L. Neutralization of proteolytic and hemorrhagic activities of Costa Rican snake venoms by a polyvalent antivenom. **Toxicon** v.23, p.887-893, 1985.

GUTIÉRREZ, J.M.; OWNBY, C.L., ODELL, G.V. Pathogenesis of myonecrosis induced by crude venom and a myotoxin of *Bothrops asper*. **Exp. Mol. Pathol.** v.40 p.367-379, 1984.

GUTIÉRREZ, J.M.; CERDAS, L. Mecanismos de acción de miotoxinas aisladas de venenos de serpientes. **Rev. Biol Trop.** v.32 (2), p.213-222, 1984.

HARRIS, J.B.; CULLEN, M.J. Muscle necrosis caused by snake venoms and toxins. **Electron Microsc Rev.** vo.13(2) p.83-211, 1990.

HU, R.; WANG, J.; LEI, K. Isolation and properties of L-amino acid oxidase from *Ophiophagus hannah* venom. **Sci Sin B.** v.25(9) p.941-952, 1982.

HUANG, M. Z. et al. Complete amino acid sequence of an acidic, cardiotoxic phospholipase A2 from the venom of *Ophiophagus hannah* (king cobra): a novel cobra venom enzyme with "pancreatic loop", **Archives of biochemistry and biophysics.** 338, p.150– 156, 1997.

IBAMA http://www.ibama.gov.br/ran/index.php?id_menu=130&id_arq=17- acesso em 19 de setembro de 2008.

IKAI, A. Thermostability and aliphatic index of globular proteins. **J Biochem.** v.88(6) p.1895-1898, 1980.

- ISMAIL, M. The scorpion envenoming syndrome. **Toxicon**, v.33, p. 825-858, 1995.
- IWANAGA,S.; SUZUKI,T. Enzymes in snake venom. In: ---- LEE,C.Y. **Snake venom**. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg New York, 1979. p. 61-158.
- IZIDORO, L. F. M. et al. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.14 p.7034–7043, 2006.
- JACKSON, K. The evolution of venom delivery systems in snakes. **Zoological journal of the Linnean Society** v.137 p. 337-354, 2003.
- JACOBSON, A. et al. Expression of hyaluronan synthase 2 or hyaluronidase 1 differentially affect the growth rate of transplantable coloncarcinoma cell tumors. *International journal of cancer*. v.102 p.212–219, 2002.
- JESPERSEN, J.; ASTRUP, T. A study of the fibrin plate assay of fibrinolytic agents. Optimal conditions, reproducibility and precision. **Haemostasis** v.13(5) p.301-315, 1983.
- JIM, J.; SAKATE, M. *Biologia das Serpentes*. In: ___ **Venenos animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro: Ed. de Publicações Científicas. Cap 9, 1994, p.109-134.
- JORGE, M. T. et al. A. Snakebite by the Bushmaster (*Lachesis muta*) in Brazil: Case report and review of the literature. **Toxicon**, v. 35. (4), p. 545 -554. 1997.
- JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. L.; Ho, P. L. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene** v.299(1-2), p.279-91, 2002.
- KARALLIEDDE,L. Animal toxins. **Brit. Jour.of.Anaest.** v.74 p319-327, 1995.
- KARDONG, K. V. **Vertebrates**: comparative anatomy, function, evolution. Boston: McGraw Hill, 2002.
- KEOGH, J.S. Molecular phylogeny of elapid snake and consideration of their biogeographic history. **Biol.Journ of the Linn. Soc.** V.63,p.177-203,1998.
- KISHIMOTO, M.; TAKAHASHI, T. A spectrophotometric microplate assay for L-aminoacid oxidase. **Analytical Biochemistry** v.298 p.136-139, 2001.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". **Nature**, v. 227, 680-685, 1970.

LASKOWSKI, R.A. et al. PROCHECK: A program to check the stereochemical quality of protein structures. **J. Appl. Cryst.** V.26 p. 283-291, 1993.

LEE, M. L. et al. Antibacterial action of a heat-stable form of L-amino acid oxidase isolated from king cobra (*Ophiophagus hannah*) venom. **Comp Biochem Physiol C Toxicol Pharmacol.** 153(2) p.237-242, 2011.

LEE, C. Y. **Snake venoms:** Handbook of experimental pharmacology. Germany: Springer-Verlag Berlin Heidelberg, 1979.

LEITÃO, D. P. S.; POLIZELLO, A. C. M.; ROTCHILD, Z. Coagulation and fibrinolysis in capybara (*Hydrochaeris hydrochaeris*), a close relative of the guinea pig (*Cavia porcellus*). **Comp. Biochem. Phys.** Part A, v.125, p.113-120, 2000.

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature Reviews Drug Discovery.** v.2, p.790-802, 2003.

LI, R. et al. L-aminoacid oxidase from *Naja atra* activates and binds to human platelets. **Acta biochimica et biophysica Sinica.**v.40, p.19-26, 2008.

LOCKSHIN, R. A.; ZAKERI, Z. Cell death in health and disease. **Journal of Cellular & Molecular Medicine.** v.11(6), p.1214–1224, 2007.

LOKESHWAR, V. B.; SELZER, M. G. Differences in hyaluronic acid-mediated functions and signaling in arterial, microvessel, and vein-derived human endothelial cells. **The Journal of biological chemistry.** v. 275, p.27641–27649, 2000.

LOMONTE, B.; TARKOWSKY, A.; HANSON, L. A. Host response to *Bothrops asper* snake venom: analysis of edema formation, inflammatory cells and cytokine release in a mouse model. **Inflammation** v.17, p. 93-105, 1993.

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

MACHEROUX, P. et al. Studies on the glycosylation of L-aminoacid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. In GHISLA, S. KRONECK, P.; MACHEROUX, P.; SUND, H. Flavins and Flavoproteins. Rudolf Weber, Berlin, p583-586, 1999.

MACKESSY, S. P. Desert Massasauga Rattlesnake (*Sistrurus catenatus edwardsii*): a technical conservation assessment. <http://www.fs.fed.us/r2/projects/scp/assessments/massasauga.pdf>, 2005. Data de acesso: 31 de julho de 2011

MAGALHÃES, H. P. B. et al. Mechanism of action and determination of the best substrate for a trombin like enzyme from *Lachesis muta muta* venom by regression analysis of the kinetic parameters determined with peptidyl p nitroanilide substrates. **Toxicon** v.47, n°4, p.453-8, 2006.

MAGALHAES, A. et al. Coagulant thrombin-like enzymes from the venoms of Brazilian and Peruvian bushmaster (*Lachesis muta muta*) snakes. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & molecular biology**; v. 136(2), p. 255-66, 2003.

MAIA, I.G.; LEITE, A. N-glycosylation in sugarcane. **Genet. Mol. Biol.** [online], v. 24 (1-4), p. 231-234, 2001.

MÁLAQUE, C. M. S. et al. V. *Animais peçonhentos no Brasil, Bilologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentados*. São Paulo: Sarvier, 2003 p.87-90.

MANDAL, S. BHATTACHARYYA, D. Two L-aminoacid oxidase isoenzymes from Russell's viper (*Daboia russelli russelli*) venom with different mechanisms of inhibition by substrate analogs. **Febs J.** v.275(9) p.2078-2095, 2008.

MARSHALL, R.D. The nature and metabolism of the carbohydrate-peptide linkages of glycoproteins. **Biochem Soc Symp.** v. 40 p.17-26, 1974.

MATTEVI, A. et al. Crystal structure of D-aminoacid oxidase: a case of active site mirror image convergent evolution with flavocytochrome b₂. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v.93, 7496-7501, 1996.

MCF-7. Human breast adenocarcinoma cell line: General Information. Las Vegas: Estados Unidos. Disponível em: <http://mcf7.com/mcf7.html> Acesso em: 02 ago. 2011.

MELGAREJO, A.R. Serpentes Peçonhentas do Brasil In: --- **Animais peçonhentos no Brasil, Bilologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentados**. São Paulo: Sarvier, 2003 p.33-61.

MCNAUGHT, A. D.; WILKINSON, A. (Comp) IUPAC, Compendium of chemical terminology. (The "Gold Book") 2. ed. Oxford: Blackwell Scientific Publications, 1997.

MENEZES, M.C. et al. Sex based individual of snake venom proteome among eighteen *Bothrops jararaca* siblings. **Toxicon** v.47, p 304-312, 2006.

MIKUS, J.; STEVERDING, D. A simple colorimetric method to screen drug cytotoxicity against *Leishmania* using the dye Alamar Blue. **Parasitol Int.** v.48(3) p.265-269, 2000.

MILIJANICH, G. P. Venom peptides as human pharmaceuticals. **Science & Medicine.** Sep/oct, p.6-15, 1997.

MOORE, K. S. et al. Antimicrobial peptides in the stomach of *Xenopus laevi*. **The Journal of biological chemistry.** v. 15;266(29) p. 19851-19857, 1991.

MOREIRA, L. et al. Pathological changes induced by BaH1, a hemorrhagic proteinase isolated from *Bothrops asper* (Terciopelo) snake venom, on mouse capillary blood vessels. **Toxicon**, v.32(8) p.976-87, 1994.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **J Immunol Methods.** v.65(1-2), p.55-63, 1983.

MOURA, R. S. et al. Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon**, v.36 n°. 5, p.771-780, 1998.

MOUSTAFA I. M. et al Crystal structure of LAAO of *Calloselasma rhodostoma* with L-phenylalanine substrate: insights into structure mechanism. **Journal of Molecular Biology** v.364, p.991-1002, 2006.

MUELAS, S.; NOGAL-RUIZ, J. J.; GÓMEZ-BARRIO, A. Setting of a colorimetric method to determine the viability of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, Germany, v.86, n. 12, p. 999-1002. Dec. 2000.

NELSON, D.L.; COX, M. M. **Lehninger** Principios de Bioquímica. New York: W.H. Freeman and Company. Cap.4. 2008. p.113-152.

NICHOLLS, A.; SHARP, K.; HONIG, B. **Proteins, Structure, Function and Genetics.** Vol 11 (4), p. 281, 1991.

OCHOA, J.L. Hydrophobic (interaction) chromatography. **Biochimie.** v.60(1) p.1-15, 1978.

OH, J. Y. et al. Complement depletion with cobra venom factor delays acute cell-mediated rejection in pig-to-mouse corneal xenotransplantation. **Xenotransplantation**; 17(2) 140-6, 2010.

OTERO, R. et al. Comparative study of the venoms of three subspecies of *Lachesis muta* (bushmaster) from Brazil, Colombia and Costa Rica. **Toxicon** v.36, n.12, p2021-2027, 1998.

OWNBY, C. L.; KAINER, R.A.; TU, A.T. Pathogenesis of hemorrhage induced by rattlesnake venom. **American Journal of Pathology**, 76 p.401–414, 1974.

PAVIA, D. L.; LAMPMAN, G. M.; KRIZ, G. S. **Introduction to spectroscopy**: a guide for students of organic chemistry. Third edition, United States: Thomson Learning, 2001.

PAWELEK, P. D. et al. The structure of L-aminoacid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. *European Molecular Biology Organization*, v.39, n.16, p4204-4215, 2000.

PEIGNEUR, S. et al. A bifunctional sea anemone peptide with Kunitz type protease and potassium channel inhibiting properties. **Biochem Pharmacol**. v.82(1), p.81-90, 2011.

PENN, R. D.; PAICE, J. A. Adverse effects associated with the intrathecal. **Pain**, v. 85, p. 291-296, 2000.

PELHAM, H.R.; JACKSON, R.J. An efficient mRNA-dependent translation system from reticulocyte lysates. **Eur J Biochem**; v.67(1) p.247-56, 1976.

PETERSON, G.L. Determination of total protein. In: *Methods in enzymology*, Enzyme Structure, v.91, Part I, (HIRS, C.H.W. TIMASHEEFF, N.Eds.) Academic Press, New York, 1983.

PONNUDURAI, G.; CHUNG, M. C. M.; TAN, N. H. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from Malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. **Archives of biochemistry and biophysics**, v.313(2) p.373-378, 1994.

PONTES, F. Doenças negligenciadas ainda matam 1 milhão por ano no mundo. **Inovação em pauta**. Disponível em: <http://www.finep.gov.br/imprensa/revista/edicao6/inovacaoem_pauta6doencasnegl.pdf> Acesso em: 05 ago. 2011.

POSSANI, L. D. et al. Scorpion toxins specific for Na⁺ channels. **Eur. J. Biochem.**, v. 264, p. 287-300, 1999.

QUIJADA-MASCARENHAS, A.; WUSTER, W. In: **Handbook of venoms and toxins of reptiles**. Boca Raton: CRC Press Taylor & Francis Group, 2010, cap.2 p. 25-64.

RIBEIRO, D. T.; FARIAS, I. P. HRBEK, T. Houve radiação adaptativa na história evolutiva das arraias de água doce da família Potamotrygonidae? **Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008**. Disponível em: www.sbg.org.br - ISBN 978-85-89109-06 Acesso em: 08 ago. 2011.

RIDGEWAY, B.; WALLACE, M.; GERAYLI, A. Ziconotide for the treatment of severe spasticity after spinal cord injury. **Pain**, v. 85, p. 287-289, 2000.

RODRIGUES, R.S. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie** v.91(4) p.490-501, 2009.

ROLÓN, M. et al. F. Selective activity of polyene macrolides produced by genetically modified *Streptomyces* on *Trypanosoma cruzi*. **Int J Antimicrob Agents**, v.28(2) p.104-109, 2006.

RUCAVADO A., et al. Proteomics of wound exudate in snake venom-induced pathology: search for biomarkers to assess tissue damage and therapeutic success. **J Proteome Res**. v.10, p. 1987-2005, 2011.

RUCAVADO, A. et al. Increments in cytokines and matrix metalloproteinases in skeletal muscle after injection of tissue-damaging toxins from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Mediators of inflammation**. v. 11(2), p. 121–128, 2002.

RUSSEL, J. B. **Química Geral 1**, 2ª Edição, Rio de Janeiro: Makron Books do Brasil, 1992.

SAKURAI, Y. et al. Anticoagulant activity of M-LAAO; L- amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blonhoffii* through selective inhibition of factor IX. **Bioch. Biophys. Acta**,v.1649, p.51-57, 2003.

SAMEL, M. et al. L-Amino acid oxidase from *Naja naja oxiana* venom **Comparative Biochemistry and Physiology, Part B** v.149 p.572–580, 2008

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

SANCHEZ, E. F. et al. Isolation of a proteinase with plasminogen-activating activity from *Lachesis muta muta* (Bushmaster) snake venom. **Arch.Biochem.Biophys.** Jun v.1378(1), p131-141, 2000.

SANCHEZ, E. F. et al. Biological activities of venoms from South American snakes. **Toxicon**. v.30(1):95-103, 1992.

SANCHEZ, E. O. ; MAGALHÃES, A. Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (Surucucu Pico de Jaca) *Lachesis muta muta* venom. **Braz J Med Biol Res** 1991 v.24(3) p.249-260.

SANTOS, F. J. N. et al. Horseradish peroxidase-catalyzed oxidation of rifampicin: reaction rate enhancement by co-oxidation with anti-inflammatory drugs. **Biol Pharm Bull.** v.28(10) p.1822-1826, 2005.

SANZ, L. et al. Snake venomomics of the South and Central American Bushmasters. Comparison of the toxin composition of *Lachesis muta* gathered from proteomic versus transcriptomic analysis. **J. Proteomics.** v.71, p.46- 60, 2008.

SERRANO, S. M. et al. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. *Journal of Biological Chemistry* v. 281:39 p.746–756, 2006.

SERENO, D.; LEMESRE, J.L. Use of an enzymatic micromethod to quantify amastigote stage of *Leishmania amazonensis* in vitro. **Parasitology Research.** v.83(4) p.401-403, 1997.

SIEUWERTS, A.M. et al. The MTT tetrazolium salt assay scrutinized: how to use this assay reliably to measure metabolic activity of cell cultures in vitro for the assessment of growth characteristics, IC50-values and cell survival. **Eur J Clin Chem Clin Biochem.** v.33 (11) p.813-823, 1995.

SIX, D.A.; DENNIS, E.A.. The expanding superfamily of phospholipase A2 enzymes: classification and characterization. **Biochemistry biophysic acta** 1488, p. 1–19, 2000.

SOARES DE MOURA, R. et al. Pharmacological aspects of mouse hind-paw oedema induced by *Lachesis muta rhombeata* venom. **Toxicon.** v.36(5) p771-80, 1998.

SOCIEDADE BRASILEIRA DE HERPETOLOGIA. *Brazilian reptiles – List of species.* 2011. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br>>. Acesso em: 03 ago. 2011.

SOUZA, R. C. G. Reproduction of the Atlantic Bushmaster (*Lachesis muta rhombeata*) for the First Time in Captivity. **Bull. Chicago Herp. Soc.** v. 42 (3), p. 41-43, 2007.

SOUZA, R. C. G. Concerning *Lachesis* and Capoeira: An Anti-Article by a Brazilian Outsider. **Bull. Chicago Herp. Soc.**, v. 41 (4), p. 65-68, 2006.

SOUZA, D. H. et al. The desintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin-mediated cell adhesion. *Arch. Biochem. Biophys.* V.384, n.2, p341-350, 2000.

SOUZA, H. F. et al. Isolation and structural characterization of a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom: preliminary crystallographic data. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 368,p.285-290, 1999.

STABELI, R. G. et al. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry** v.12(11) p.2881-6, 2004.

STEPHANO, M. A. et al. The improvement of the therapeutic anti-*Lachesis muta* serum production in horses. **Toxicon**; v. 45(4), p. 467-73, 2005.

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

SUBRAMANIAN, S. Dye-ligand affinity chromatography: the interaction of Cibacron Blue F3GA with proteins and enzymes. **CRC Crit Rev Biochem**. v.16(2) p.169-205, 1984.

SUHR, S. M.; KIM, D. S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. **Biochem Biophys Res Commun**, v.224 p.134–139,1996.

SUN, M. Z. et al. Biochemical and structural characterization of Akbu-LAAO: a novel snake venom L-aminoacid oxidase from *Agkistrodon blomhoffi ussurensis*. **Biochimie** v. 92, p343-349, 2010.

SUN, L. K., et al. Apoptotic effect in the glioma cells induced by specific protein extracted from Okinawa Habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom in relation to oxidative stress. **Toxicology In Vitro**, v.17, p.169–77, 2003.

TAN, L.; LEYKAM, J. F.; KIELISZEWSKI, M. J. Glycosylation motifs that direct arabinogalactan addition to arabinogalactan-proteins. **Plant Physiol**. v.132(3) p.1362-1369, 2003.

TAN, N.H. L-amino acid oxidases and lactate dehydrogenases. In: **Bailey, G.S. (Ed.), Enzymes From Snake Venom**. Alaken Inc., Fort Collins, CO, pp. 579–598, 1998.

TAN, N. H.; CHOY, S. K. The oedema activity of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom L amino acid oxidase. **Toxicon**, v.32,p.539-594, 1994.

TAN, N. H.; SWAMINATHAN, S. Purification and properties of the L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. **Int J Biochem**. v.24(6), p.967-973, 1992.

TAN, N. H., SAIFUDDIN, M. N. Substrate specificity of kingcobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **The International Journal of Biochemistry** 23, 323–327 1991.

TEMPONE, A. G. et al. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp with hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications** v.280, p.620-624, 2001.

TIAN, H. Y. et al. New bufadienolides and c(23) steroids from the venom of *Bufo gargarizans*. **Steroids**, v.75 (12), p.884-90, 2010.

TOMLINSON E. Chromatographic hydrophobic parameters in correlation analysis of structure-activity relationships, Review. **J. Chromatogr.** v. 113(1) p.1-45, 1975

TÖNISMAGI, K. et al. L-Amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: Isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon** v.48 p.227–237, 2006.

TYTGAT, J. et al. A unified nomenclature for short-chain peptides isolated from scorpion venoms: α KTx Molecular subfamilies. **Trend in Pharmacological Sciences**, Amsterdam, v.20, p.4-447, 1999.

VALDIVIA, H. H. et al. Scorpion toxins targeted against the sarcoplasmic reticulum Ca^{2+} release channel of skeletal and cardiac muscle. **Proc. Natn. Acad. Sci.** Washington, v.89, p. 12185-9, 1992.

VAN der WALT S. J., JOUBERT F.J. Studies of puff adder (*Bitis arietans*) venom I. Purification and properties of protease A. **Toxicon** v.26(7) p.629-637, 1988.

VEGA, C. et al, A new pharmacological screening assay with *Trypanosoma cruzi* epimastigotes expressing beta-galactosidase. **Parasitology research**, v. 95, n. 4, p. 296-298, 2005.

VESTERBERG, O. Isoelectric focusing of proteins. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 257, p. 11-19, 1972.

VOET, D.; VOET, J.G. **Biochemistry**. 2^o. Ed. New York: John Wiley and Sons, 1995

VOGEL, A.I. **Vogel's textbook of quantitative chemical analysis**. New York: Longman Scientific and Technical, 1989. Cap.10, p.372-373

WEI, J. F.; YANG, H. W. WEI, X. L. et al. Purification, characterization and biological activities of the L-amino acid oxidase from *Bungarus fasciatus* snake venom. **Toxicon**, v.54, p.262-271, 2009.

WEI, X. L. et al Purification, characterization and potent lung lesion activity of an L-amino acid oxidase from *Agkistrodon blomhoffii ussurensis* snake venom. **Toxicon** v. 50 p. 1126-1139, 2007.

WILKINSON, G.N. Statistical estimations in enzyme kinetics. **Biochem. J.** v.80, p 324-332, 1961.

ZAMUDIO, K. R. ; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster (*Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biol. J. Linn. Soc.** v.62, p 421-442, 1997.

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

ZHANG,L. WU, W.T. Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-aminoacid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom. **Natural Product Research** v.22 n.15 p.554-563, 2008.

ZHANG, Y. et al Structure-function relationship of king cobra cathelicidin. **Peptides.** v. 31(8) p.1488-1493, 2010.

ZHONG, S. R. et al. Purification and characterization of a new L-aminoacid oxidase from *Daboia russellii siamensis* venom. **Toxicon** v.54, p.753-771, 2009.

ZYCAR, B. C. et al, Contribution of metalloproteases, serine proteases and phospholipases A2 to the inflammatory reaction induced by *Bothrops jararaca* crude venom in mice. **Toxicon** v.55 p. 227-234, 2010.

Anexos

ANEXO – Certificado de aprovação pela Comissão de Ética no Uso de Animais.**UNIVERSIDAD DE COSTA RICA
VICERRECTORIA DE INVESTIGACION
COMITÉ INSTITUCIONAL DEL CUIDO Y USO DE ANIMALES**

Martes 20 de mayo de 2008
CICUA-012-08

Doctora
Teresa Escalante
Instituto Clodomiro Picado

Estimada señora:

En la sesión numero 79 del Comité Institucional del Cuido de Animales (CICUA), del martes 20 de mayo se conoció su aclaración sobre la razón por la que usan la metodología para determinar la DL 50 según los lineamientos de la OMS para la determinación de la potencia de venenos de serpientes.

Me agrada comunicarle que entonces su propuesta de proyecto de investigación: “Evaluación y mejoramiento de la calidad de los antivenenos contra mordeduras de serpiente producidos por el Instituto Clodomiro Picado” ha sido aprobado sin restricciones.

Atentamente,

Dra. Liliana Pazos
Coordinadora
CICUA

Cc: Dra. Julieta Carranza, Unidad de Gestión de la Investigación V.I.
Archivo