

**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, DE SDE 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**  
**165 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

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. 161 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 A<sub>2</sub>, 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  $\alpha$ -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 é 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 L-aminoácido oxidase e foi submetida a mais um passo cromatográfico em Mono Q®. A homogeneidade da fração com atividade L-aminoácido oxidase 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, 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 à 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  $\mu$ mol peróxido de hidrogênio/min. A sequência N-terminal dos 40 primeiros resíduos da LmLAAO purificada foi determinada por degração 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 IC<sub>50</sub> de 22,70 µg/mL, para linhagem AGS (carcinoma de estômago), e IC<sub>50</sub> de 1,41 µg/mL linhagem MCF-7 (carcinoma de mama). Para a atividade antiparasitária, foi determinada uma IC<sub>50</sub> 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 *Tripanosoma 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. 161p. 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 A<sub>2</sub>, 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  $\alpha$ -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  $\mu$ 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 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 IC<sub>50</sub> of LmLAAO on AGS cell line (stomach cancer) was 22.70 µg / mL, and the IC<sub>50</sub> 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 IC<sub>50</sub> 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 funtional 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

<b>Figura 1.</b>	Glândula de peçonha de viperídeos	4
<b>Figura 2.</b>	Cauda de uma serpente do gênero <i>Bothrops</i> .	6
<b>Figura 3.</b>	Cauda de uma serpente do Gênero <i>Crotalus</i>	6
<b>Figura 4.</b>	<i>Lachesis muta stenophrys</i>	8
<b>Figura 5.</b>	<i>Lachesis muta melanocephala</i>	8
<b>Figura 6.</b>	Mapa de distribuição geográfica das espécies de <i>Lachesis</i> na América Central	9
<b>Figura 7.</b>	<i>Lachesis muta muta</i>	9
<b>Figura 8.</b>	<i>Lachesis muta rhombeata</i>	10
<b>Figura 9.</b>	Mapa de distribuição geográfica das espécies de <i>Lachesis</i> na América do Sul	10
<b>Figura 10.</b>	Cauda de <i>Lachesis</i> sp	11
<b>Figura 11.</b>	Reação de desaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido catalisado por uma LAAO	17
<b>Figura 12.</b>	Estrutura de L-aminoácido oxidase de <i>Calloselasma rhodostoma</i> complexada com L-fenilalanina	19
<b>Figura 13.</b>	Sítio ativo em formato de Y da L-aminoácido oxidase da <i>Caloselasma rhodostoma</i>	19
<b>Figura 14.</b>	Sítio catalítico de LAAO de <i>Calloselasma rhodostoma</i> complexado com citrato	20
<b>Figura 15.</b>	Modelo estrutural dimérico de LAAO de <i>Caloselasma rhodostoma</i> com os sítios de N-Glicosilação	21
<b>Figura 16.</b>	Estrutura parcial da resina Sephacyl®	32
<b>Figura 17.</b>	Método empregado na purificação de LmLAAO em Mono Q® por meio de Gradiente segmentado.	33
<b>Figura 18.</b>	Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Shodex® por meio de gradiente segmentado.	34
<b>Figura 19.</b>	Método empregado na purificação de LmLAAO em Phenyl Sepharose® por meio de gradiente segmentado	35
<b>Figura 20.</b>	Estrutura da resina usada na cromatografia de interação hidrofóbica	36
<b>Figura 21.</b>	Método empregado na purificação de LmLAAO em Affi-Gel Blue® por meio de gradiente segmentado	37

<b>Figura 22.</b> Estrutura química do corante da resina Affi-Gel Blue®.	37
<b>Figura 23.</b> Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Analítica Vydac® por meio de gradiente segmentado	38
<b>Figura 24.</b> Formação do cátion cromóforo por meio da oxidação de <i>o</i> -fenilenodiamino.	39
<b>Figura 25.</b> Sequenciamento de aminoácidos por Degradação de Edman	44

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>ADP</b>	Adenosina Difosfato
<b>ATP</b>	Adenosina Trifosfato
<b>AZT</b>	Anilinoiazolina
<b>cDNA</b>	Ácido Desoxirribonucleico complementar
<b>CRISPs</b>	<i>Cysteine-rich secretory proteins</i> - Proteínas Secretadas Ricas em Cisteínas
<b>CK</b>	Creatinaquinase
<b>DL<sub>50</sub></b>	Dose Letal 50 %
<b>FAD</b>	Flavina Adenina Dinucleotídeo
<b>EST</b>	Expressed Sequence Tags
<b>HPLC</b>	High Performance Liquid Chromatography – Cromatografia Líquida de Alta Eficiência
<b>HMWS</b>	Padrão de Alta Massa Molar
<b>IC<sub>50</sub></b>	Concentração Inibitória 50%
<b>K<sub>m</sub></b>	Constante de Michaelis-Menten
<b>LAAO</b>	L- aminoácido oxidase
<b>LmLAAO</b>	L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta rhombeta</i>
<b>LmPB</b>	Peçonha Bruta de <i>Lachesis muta</i>
<b>LMWS</b>	Padrão de Baixa Massa Molar
<b>L-NAME</b>	L-Nitro-Arginina Metil Ester
<b>MALDI-TOF</b>	Matrix-Assisted Laser Desorption/Ionization – Time of Fly
<b>MES</b>	Ácido 2-(N-morpholino) etano sulfônico
<b>MTT</b>	Brometo de 3-(4,5-Dimetiltiazol-2-yl)-2,5-difeniltetrazolium
<b>NADH</b>	Nicotinamida Adenina Dinucleotídeo
<b>PBS</b>	Phosphate Buffered Saline (Salina tamponada com fosfato)
<b>pI</b>	Ponto Isoelétrico
<b>PITC</b>	Fenilisotiocianato
<b>PTH</b>	Feniltiohidantoína
<b>RPMI</b>	Instituto Roswell Park Memorial
<b>SDS – PAGE</b>	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com Dodecil Sulfato de Sódio

<i>t</i>	Distribuição de T-student
<b>TFA</b>	Ácido Trifluor Acético
<b>Tris-HCl</b>	2-Amino-2-hydroxymethyl-propane-1,3-diol
<b>U</b>	Distribuição de Mann–Whitney
<b>VC</b>	Volume de Coluna
<b>V<sub>max</sub></b>	Velocidade Máxima



**LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS DOS AMINOÁCIDOS**

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

## LISTA DE SÍMBOLOS

®	Registrado
<b>TM</b>	Trade Mark

## SUMÁRIO

<b>Resumo</b>	<b>i</b>
<b>Abstract</b>	<b>iii</b>
<b>Lista de Figuras</b>	<b>v</b>
<b>Lista de Tabelas</b>	<b>ix</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas</b>	<b>x</b>
<b>Lista de Abreviaturas e Siglas dos Aminoácidos</b>	<b>xii</b>
<b>Lista de Símbolos</b>	<b>xiii</b>
<b>1. INTRODUÇÃO</b>	<b>1</b>
1.1. Ordem <i>Squamata</i> , Sub-ordem 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 isoeletrico 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
<b>2 OBJETIVOS</b>	<b>26</b>
2.1. Objetivos Gerais	27
2.2. Objetivos Específicos	27
<b>3 MATERIAL E MÉTODOS</b>	<b>28</b>
3.1. Reagentes e Equipamentos	29
3.2. Peçonha	31
3.3. Fracionamento da peçonha de <i>Lachesis muta</i>	31
3.3.1. Protocolo de purificação 1	32

3.3.2	Protocolo de purificação 2	34
3.4	Ensaio de atividade L-aminoácido-oxidase	38
3.4.1	Prospecção de L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta</i> em frações obtidas por Cromatografia	39
3.5	Estudos de cinética enzimática	40
3.5.1	Determinação da especificidade de L-aminoácido oxidase de <i>Lachesis muta</i> frente a diferentes aminoácidos	40
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	40
3.5.3	Determinação da atividade L-aminoácido oxidase de LmLAAO depois de incubada em diferentes temperaturas	41
3.5.4	Determinação de $K_m$ e $V_{max}$ de LmLAAO	41
3.6	Determinação da massa molar da LAAO de <i>Lachesis muta</i>	42
3.6.1	Determinação do massa molar por eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	42
3.6.2	Determinação da massa molar por Espectrometria de Massa	42
3.7	Sequenciamento amino-terminal	43
3.8	Clonagem e sequenciamento de cDNA da LmLAAO	45
3.9	Análise <i>in silico</i>	45
3.10	Determinação do ponto isoelétrico	46
3.11	Atividades Farmacológicas	47
3.11.1	Ensaio biológicos <i>in vivo</i>	47
3.11.2	Ensaio biológicos <i>in vitro</i>	48
3.12	Análises Estatísticas	51
4	<b>CONCLUSÕES</b>	52
5	<b>REFERÊNCIAS</b>	54

# 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 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 irradiação<sup>1</sup>, 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 provavelmente quando o antigo continente do Sul, Gondwana, foi separado do continente Norte, Laurásia (IBAMA, 2008).

---

<sup>1</sup> Irradiação adaptativa é caracterizada pela evolução de um grupo de espécies as quais tem um ancestral comum (RIBEIRO et al, 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 SAKATE<sup>1</sup>, 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).

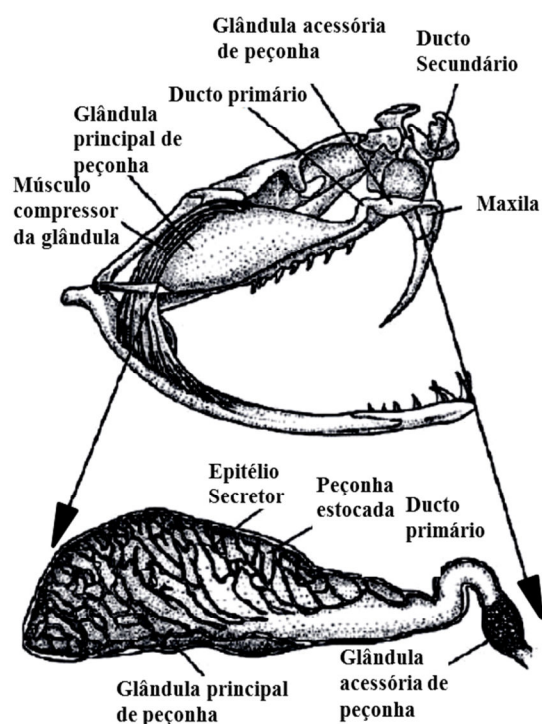
Elapídeos e Viperídeos possuem um músculo contrator de glândula que ajuda a peçonha seguir para o ducto condutor da presa (dentes). A presença deste músculo pode ser

---

<sup>1</sup> 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.

considerada como uma sinapomorfia<sup>1</sup> 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 Weisten<sup>2</sup> et al, 2002 apud Kardong, 2010, p.71.

<sup>1</sup> 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).

<sup>2</sup> 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 tem 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 de *Bothrops* sp adulta. Fotos 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 serrado 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. Fotos de Aarón Gómez (2011).

## **Gênero *Lachesis***

Os animais do gênero *Lachesis* tem 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 sequência 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 haplotipos<sup>1</sup> 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.

---

<sup>1</sup> 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



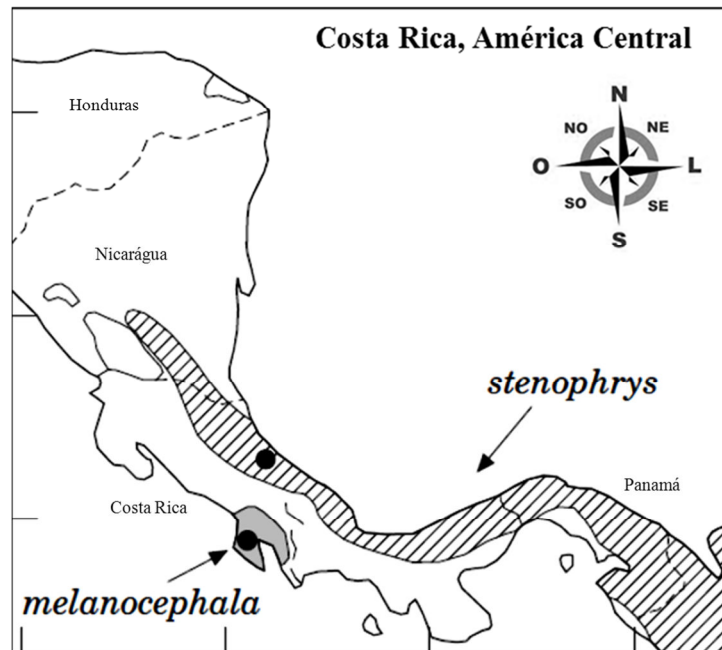


Figura 6. Mapa de distribuição geográfica das espécies de *Lachesis* na América Central. Adaptado de Zamudio e Greene, 1989 apud Campbel e Lamar, 1997, p.71.



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



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

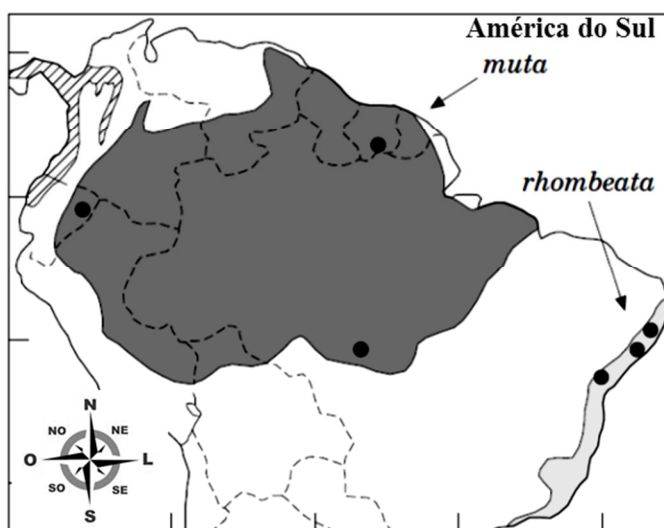


Figura 9. Mapa de distribuição geográfica das espécies de *Lachesis* na América do Sul. Adaptado de Zamudio e Greene, 1989 apud Campbel e Lamar, 1997, p.71.

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 calda 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* sp.** Detalhe das últimas fileiras subcaudais quilhadas e eriçadas e o espinho terminal. Fotos 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 vículo-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  $\alpha$  e  $\beta$  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 girotóxina 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  $\mu\text{g}$  para a peçonha de *L. m. rhombeata*, comparados com 8,7  $\mu\text{g}$  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  $\mu\text{g}$ , e de 26,0  $\mu\text{g}$  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<sub>2</sub> 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<sub>2</sub> (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  $\omega$ -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  $\text{Na}^+$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Ca}^{2+}$  e  $\text{Cl}^-$  (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  $\text{K}^+$  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 largo 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:  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{Fe}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$ ,  $\text{Mn}^{2+}$ ,  $\text{Cu}^{2+}$ ,  $\text{K}^+$ ,  $\text{Na}^+$ ,  $\text{Co}^{2+}$  (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 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hialuronidases, metaloproteases 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 A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) são enzimas cálcio-dependentes que hidrolisam duas ligações éster de 1,2-diacil-3sn-fosfoglicerídeos. São classificadas em quatro classes, sendo que as PLA<sub>2</sub> das classes I e II e III apresentam baixa massa molecular (13,000–18,000 Da), e as PLA<sub>2</sub> 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 hialuronidases 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. Hialuronidases 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). Recentemente foram estudadas novas patologias relacionadas com a atividade de metaloproteases de peçonha de serpentes e foram identificados novos substratos 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  $\alpha$ -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-NH<sub>2</sub>) EC 1.4.3 tem o oxigênio como acceptor de elétrons: EC 1.4.3.2 L-amino-acid oxidase.

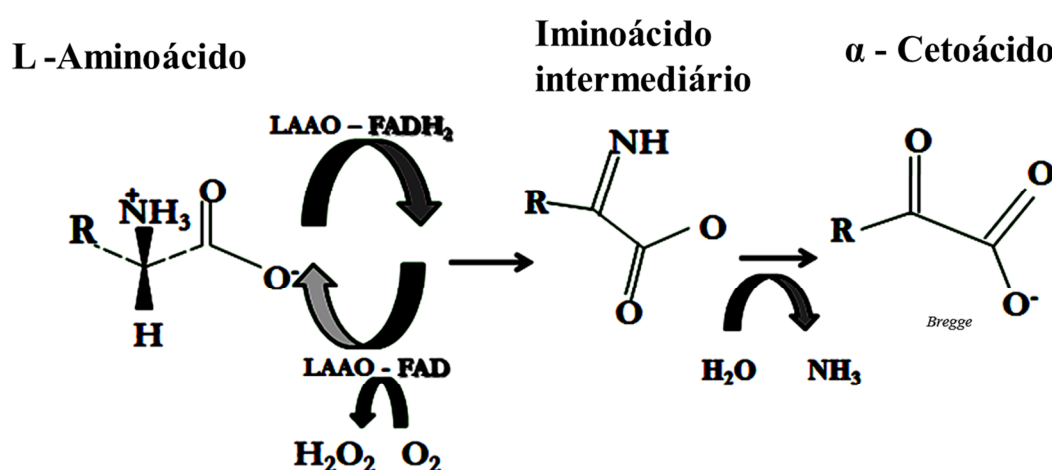


Figura 11. Reação de desaminação oxidativa estereoespecífica de um substrato L-aminoácido catalisado por uma LAAO.

#### 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.

*Cristiane Bregge da Silva*

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 *Agkistrodon 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 protômero<sup>1</sup>.

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.

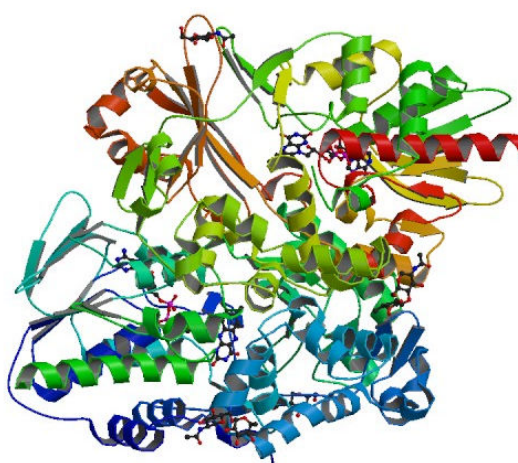
### **1.5.2. Aspectos Estruturais de LAAOs**

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  $\alpha$ -hélices e vinte e duas folhas  $\beta$  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).

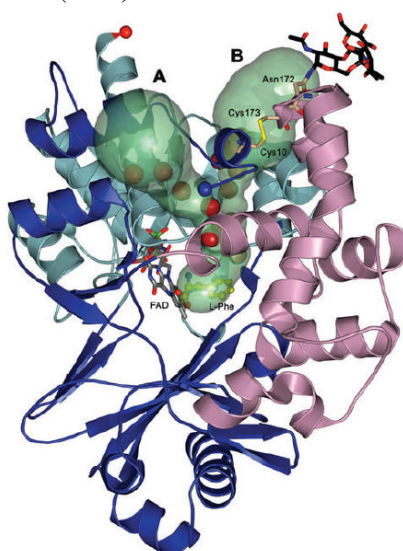
---

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

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 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).



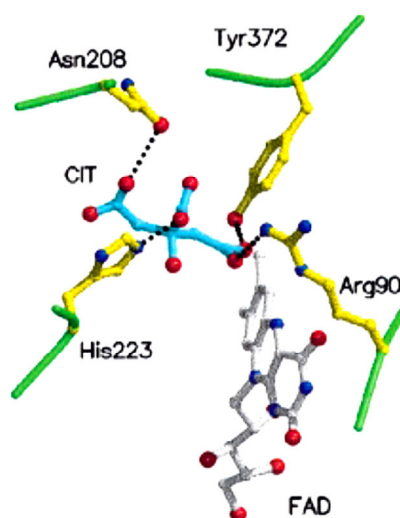
**Figura 12.** Estrutura de L-amino ácido oxidase de *Calloselasma rhodostoma* complexada com L-fenilalanina. Adaptado de Moustafa et al (2006).



**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).

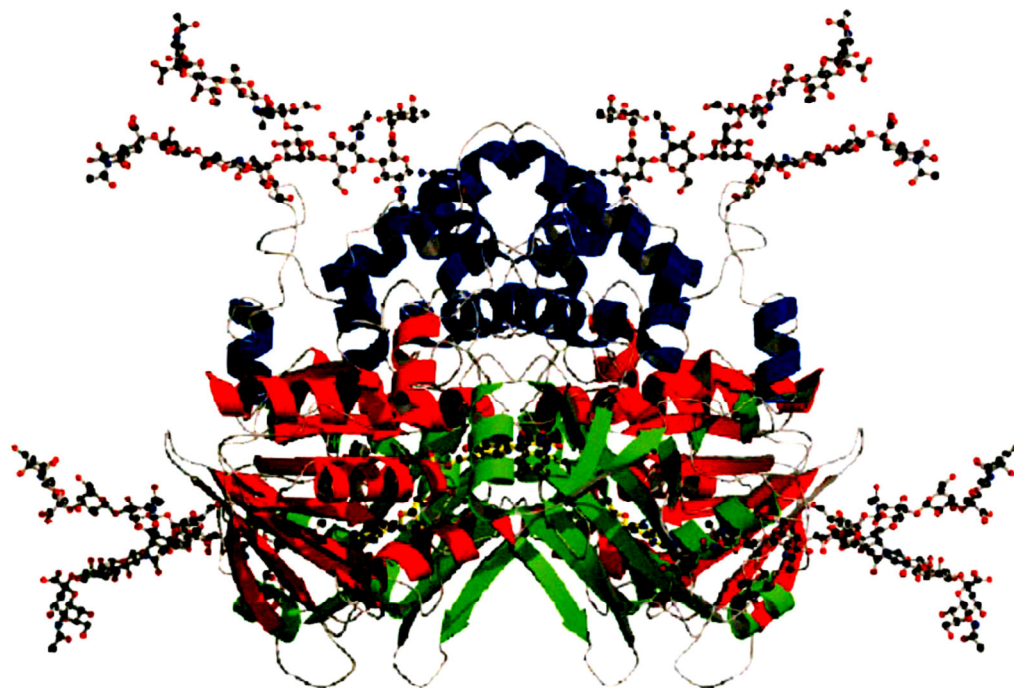


Figura 15. Modelo estrutural dimérico de LAAO de *Caloselasma rhodostoma* com os sítios de N-Glicosilação. (GEYER et al, 2001).

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  $\mu\text{M}$  e 49,3  $\mu\text{M}$ .

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 kaouthia* 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 contém 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  $A_2$ , 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 (0,094 $\mu\text{M}$ ), quanto na indução por colágeno (0,036 $\mu\text{M}$ ). 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 15 $\mu\text{g/mL}$  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  $\mu\text{g/mL}$ ) não há agregação plaquetária. No entanto, a presença de LAAO de *Naja atra* promove a potenciação da atividade da  $\text{H}_2\text{O}_2$ , 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  $H_2O_2$ , a qual promove a formação de tromboxana  $A_2$  (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. 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  $\mu$ 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  $\mu$ g/mL de LAAO de *Agkistrodon halys pallas* e em linhagens HL-60, (linhagem de células leucêmicas) com uma dose de 25 $\mu$ 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).

LAAO de *Bothrops alternatus* possui atividade hemorrágica em camundongos, em diferentes concentrações, (STÁBELI et al, 2004), assim como a LAAO de *Daboia russelli* (ZHONG et al, 2009).

#### *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 Romana (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 DL<sub>50</sub> 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*, 1,29µg/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-fenilenediamina (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 são 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

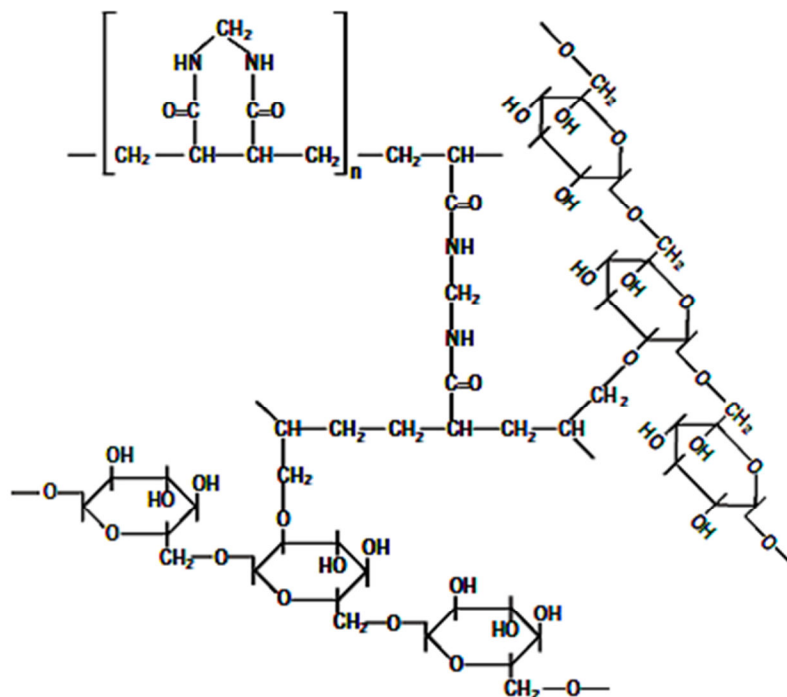
Para o fracionamento da peçonha de *Lachesis muta* foram utilizados dois protocolos distintos, os quais apresentaram características peculiares, porém em ambos os casos, forneceram a LmLAAO purificada. Neste trabalho, estes protocolos de fracionamento serão apresentados como *Protocolo de Purificação 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 7,0), 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 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.gelifesciences.com](http://www.gelifesciences.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.

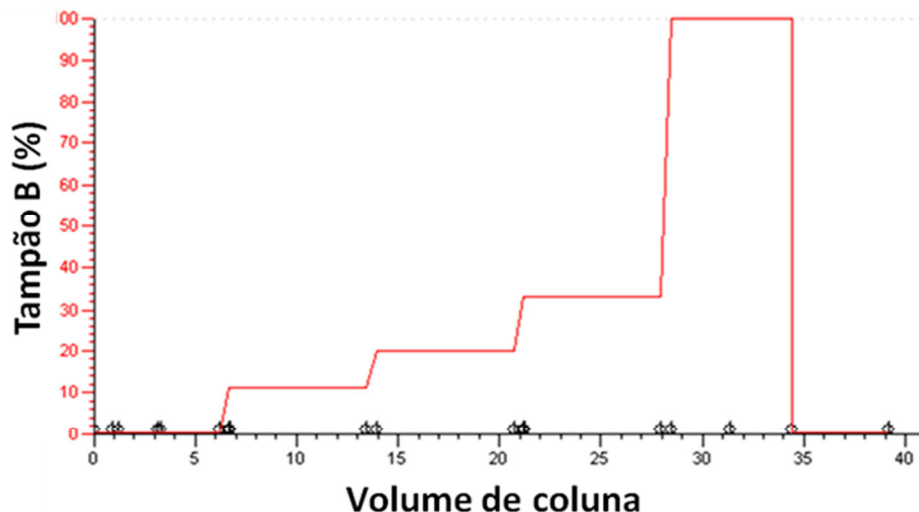


Figura 17. Método empregado na purificação de LmLAAO em Mono Q® por meio de Gradiente segmentado

***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®.

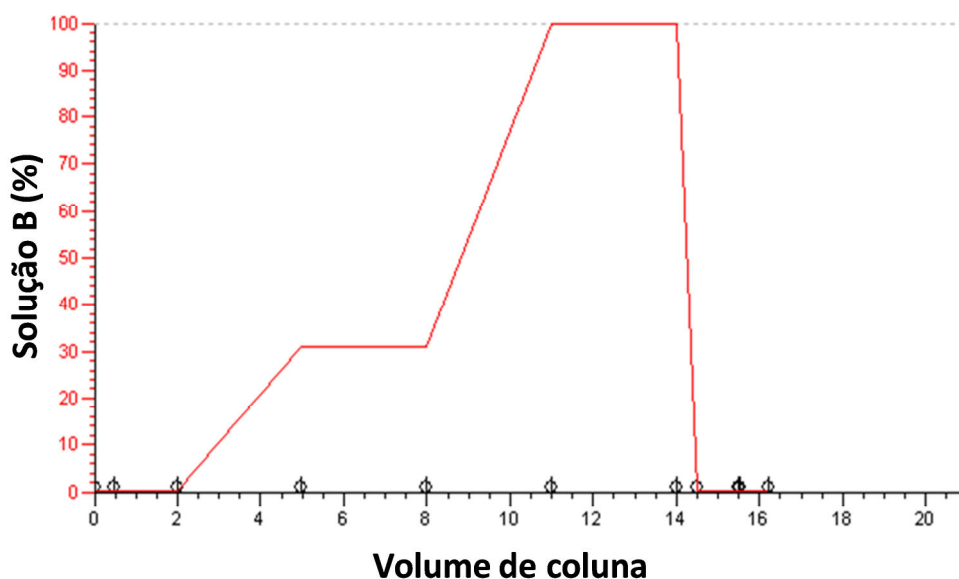


Figura 18. Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Shodex® por meio de gradiente segmentado

### 3.3.2. PROTOCOLO DE PURIFICAÇÃO 2

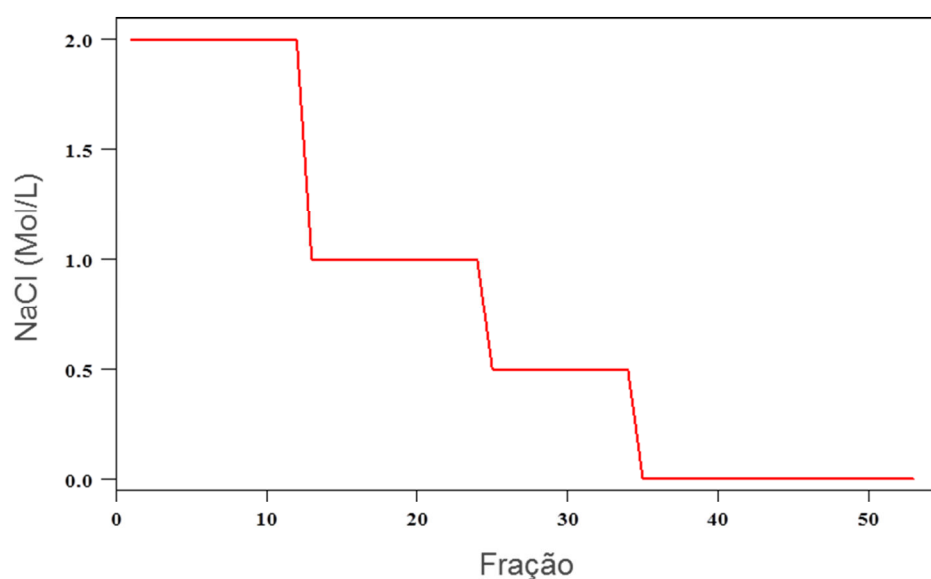
#### *Filtração em Sephacryl S-200® por Cromatografia em Baixa Pressão.*

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.

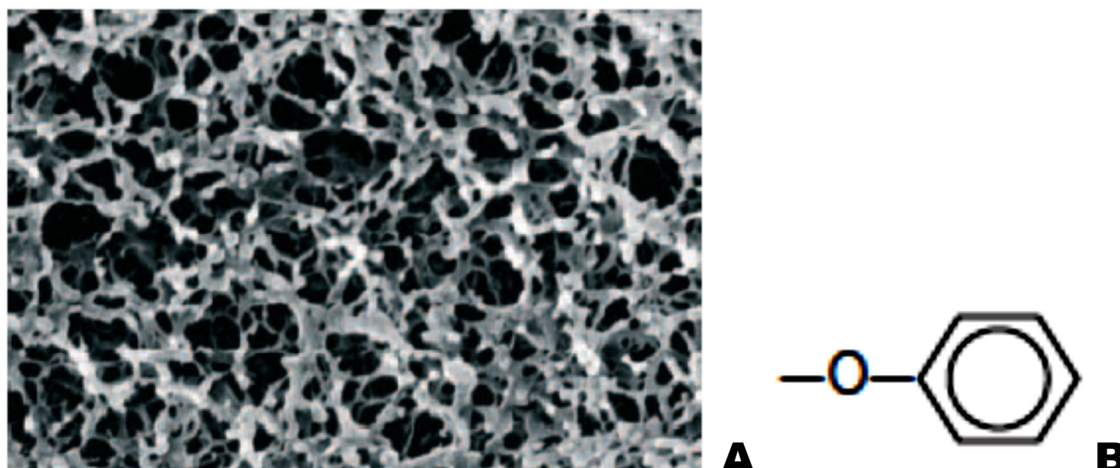
### ***Interação hidrofóbica em resina Phenyl-Sepharose® por Cromatografia Clássica***

A fração saída de *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 inter cruzada (Sefarose). B – Grupamento fenil, ligante da resina Fenil-Sepharose®. Ambas figuras disponíveis em: [www.gelifesciences.com](http://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*



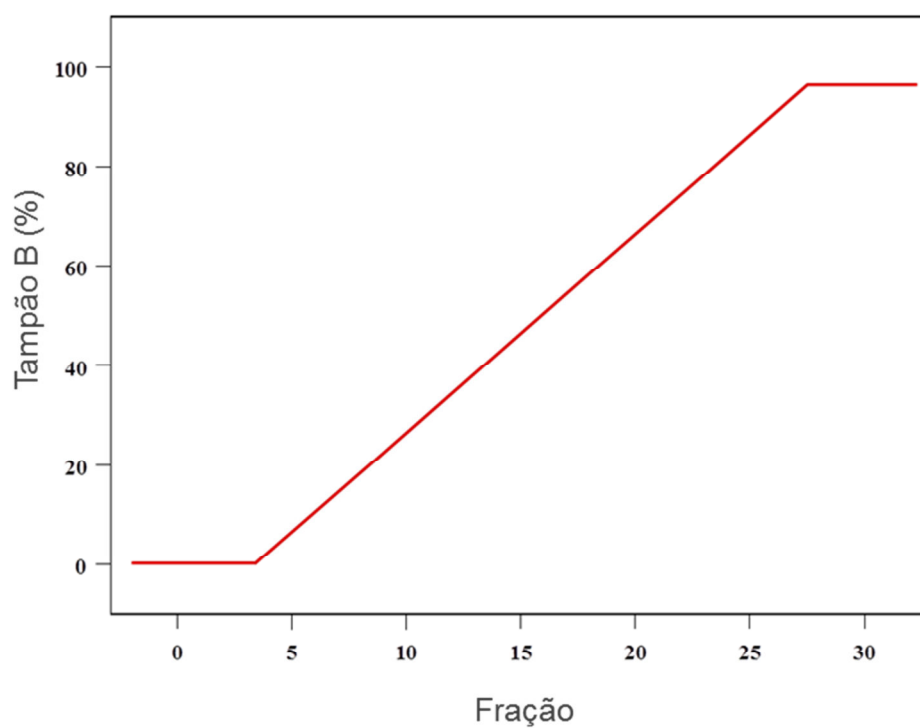
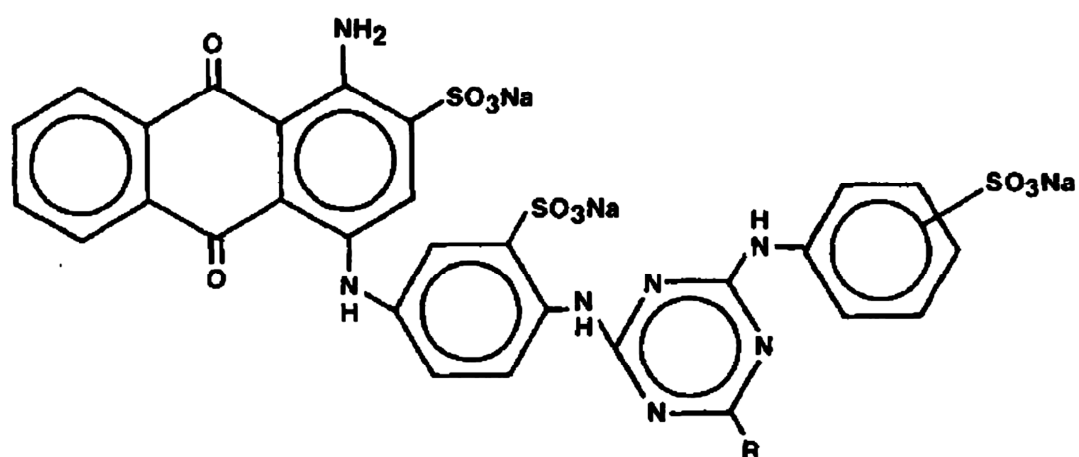


Figura 21. Método empregado na purificação de LmLAAO em Affi-Gel Blue® por meio de gradiente segmentado

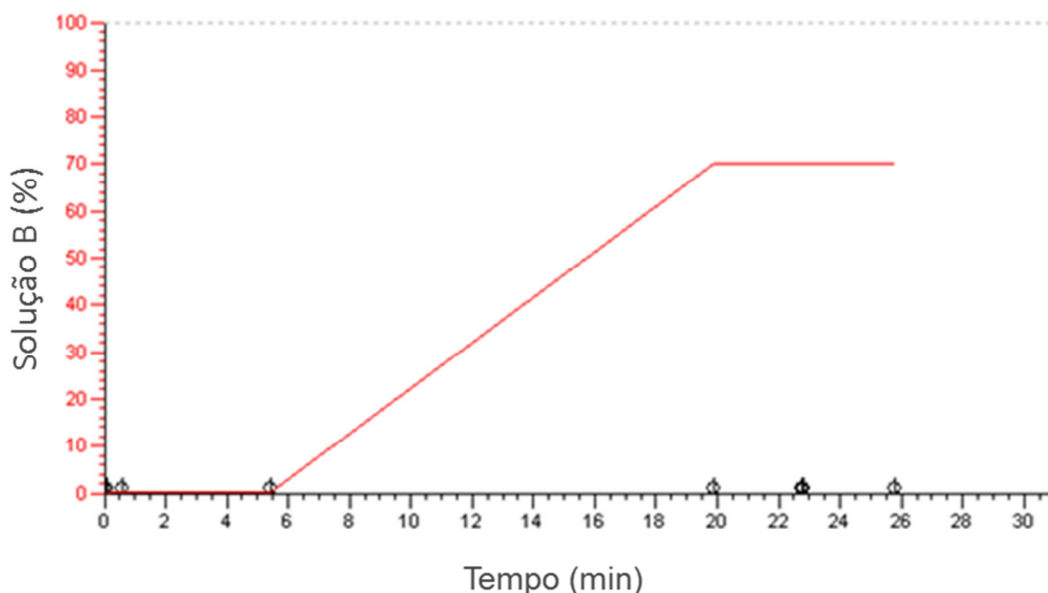


**R = -Cl = Cibacron Blue**

Figura 22. Estrutura química do corante da resina *Affi-Gel Blue*®. A matriz de agarose inter cruzada 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.

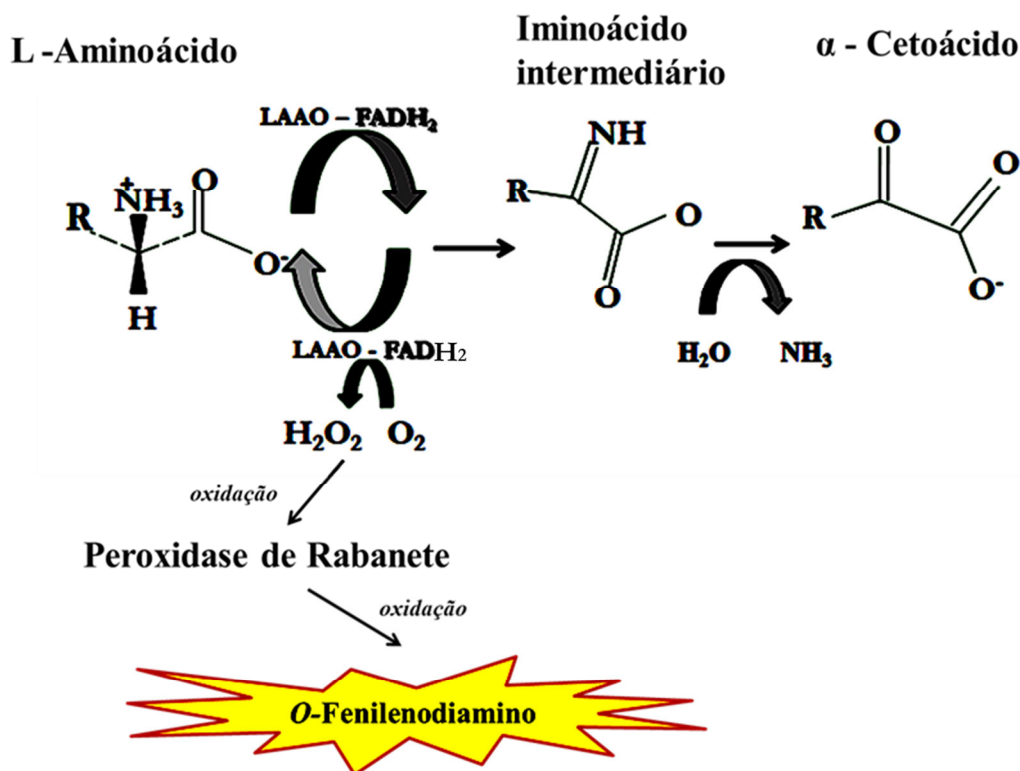


**Figura 23. Método empregado na purificação de LmLAAO em C4 Analítica Vydac® por meio de gradiente segmentado**

### ***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  $\mu\text{L}$  de mistura reacional. Após 60 minutos a reação foi interrompida pela adição de 50  $\mu\text{L}$  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*-fenilendiamino. 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*-fenilendiamino pela peroxidase de rabanete.

Dessa forma, foi realizado um protocolo no qual diferentes quantidades de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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 H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzida nos ensaios contendo LmLAAO. A padronização de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 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  $\mu\text{L}$  do eluído de cada tubo das

cromatografias a 90 µL do meio reacional citado no *ítem 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. Estes aminoácidos foram dissolvidos no meio reacional citado no *ítem 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 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 100µL (KISHIMOTO e TAKAHASHI, 2001). O tempo reacional foi de 60 minutos a 37°C e terminada com a adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> a 2 M e monitorado a 492 nm.

### ***3.5.4 Determinação de $K_m$ e $V_{max}$ de 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 H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> (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 da 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  $\mu$ L de amostra (10 - 15 $\mu$ 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,  $\alpha$ 2Macroglobulina 170 kDa,  $\beta$ Galactosidase 116 kDa, Transferrina 76 kDa, Subunidade da  $\alpha$ 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  $\beta$ -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.

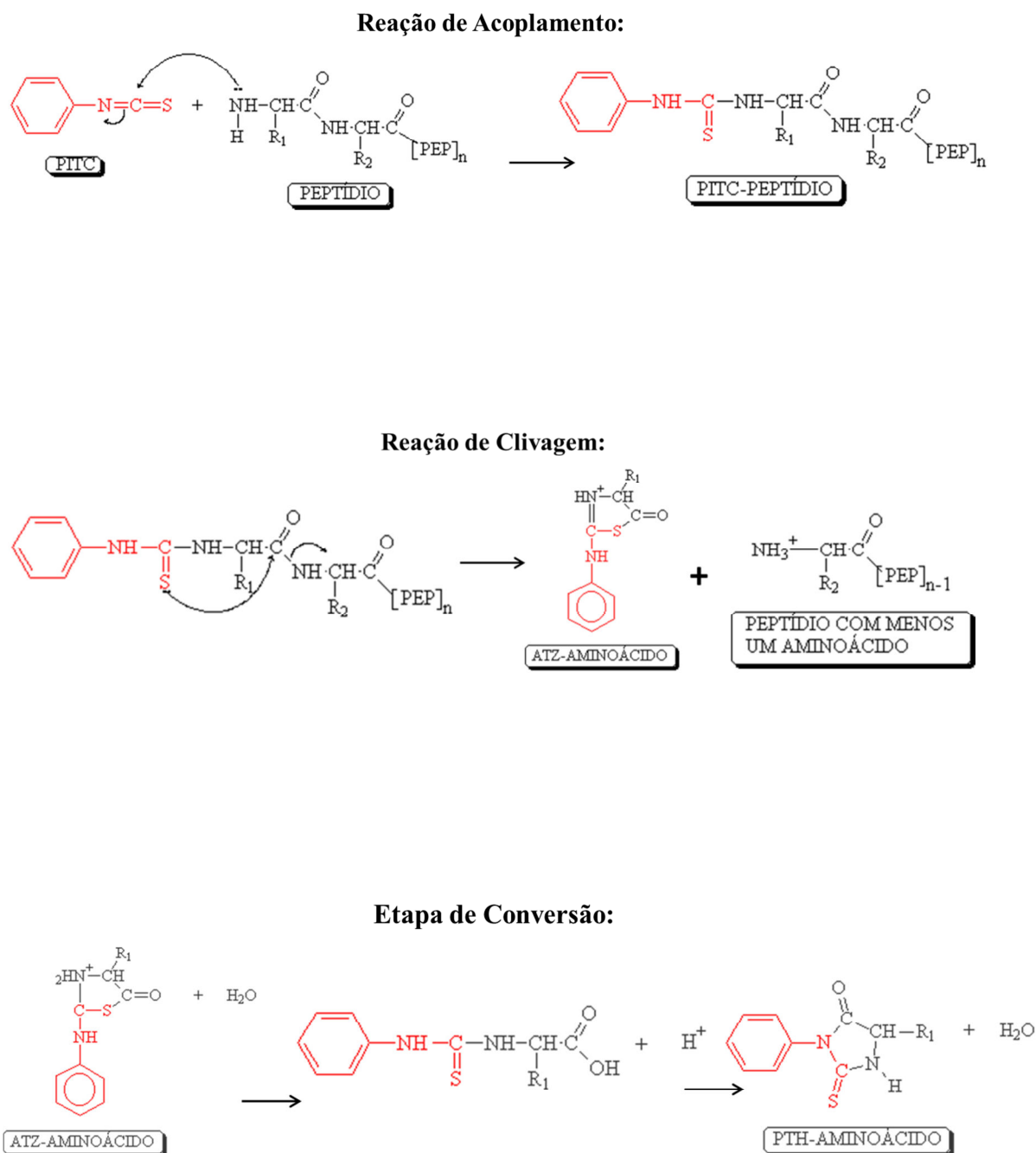
*Cristiane Bregge da Silva*

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  $\alpha$ -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 $\alpha$ , 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 seqüenciado em seqüenciador 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](http://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](http://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/>).

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 H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> 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.

#### ***Atividade Hemorrágica***

A atividade hemorrágica foi determinada pela injeção intradermal de 50 µg de LmLAAO dissolvida em 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 fora 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 CO<sub>2</sub>. 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 às 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% (IC<sub>50</sub>), 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 199<sup>1</sup> 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 1x10<sup>6</sup> 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

---

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

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

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

A forma tripomastigota da cepa CL Brener 5<sup>1</sup> foi cultivada em meio RPMI 1640<sup>2</sup> 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, 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 ao experimento 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

---

<sup>1</sup> 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)

<sup>2</sup> 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.

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 auxílio 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.

## 5. Conclusões



Este trabalho mostrou o desenvolvimento de dois protocolos de purificação. 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 viabilidade 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 citotoxicidade 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<sup>+</sup> 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<sup>+</sup> 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. bistriata* and *S.raptoria* venoms: inhibition of GABA uptake and convulsivant 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 FLp. 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 bistrata* 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](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-Sistemica-Filogenetica>> 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.1 3(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](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. Ruldolf 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 mitroanilide 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 Acidentes*. 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 b<sub>2</sub>. **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, Biologia, Clínica e Terapêutica dos Acidentes**. 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 laevis*. **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, p.2021-2027, 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/inovacaoempauta6doencasnegl.pdf>>

Acesso em: 05 ago. 2011.

- POSSANI, L. D. et al. Scorpion toxins specific for Na<sup>+</sup> 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 araias de água doce da família Potamotrygonidae? **Resumos do 54º Congresso Brasileiro de Genética, 2008**. Disponível em: [www.sbg.org.br](http://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**, 2<sup>a</sup> 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. **Biochimistry 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-amino acid 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 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

TÕNISMAGI, 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:  $\alpha$ 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**. 2º. 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-aminoacid 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.