UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO

FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

**Caracterização Funcional e Estrutural de uma
L-Aminoácido Oxidase do Veneno de *Bothrops
jararacussu* e avaliação da sua Ação Antitumoral,
Antiparasitária e Bactericida.**

**Tese de Doutorado apresentada ao programa
de Pós-Graduação em Toxicologia para a
obtenção do título de Doutor em Toxicologia,
área de concentração: Toxicologia.**

Orientado: FABIO KISS TICLI

Orientadora: Profa. Dra. SUELY VILELA

**Ribeirão Preto
2006**

FICHA CATALOGRÁFICA

Ticli, Fabio Kiss

Caracterização funcional e estrutural de uma L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua ação antitumoral, antiparasitária e bactericida. Ribeirão Preto, 2006.

94 p. : il. ; 30cm

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

Orientadora: Sampaio, Suely Vilela.

1. *Bothrops jararacussu*. 2. L-aminoácido oxidase. 3. Antitumoral. 4. Bactericida. 5. Antiparasitária.

Folha de assinaturas comissão julgadora Tese de Doutorado

Autor: **FABIO KISS TICLI**

Título: Caracterização Funcional e Estrutural de uma L-Aminoácido Oxidase do Veneno de *Bothrops jararacussu* e avaliação da sua Ação Antitumoral, Antiparasitária e Bactericida.

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Prof(a) Dr(a)

Trabalho defendido e aprovado pela Comissão Julgadora em __/__/2006

Dedico esta tese:

Aos meus filhos, Laís Ribeiro Ticli e Gabriel Ribeiro Ticli.

**Apreendi com vocês que não existe ciência que explica o amor
Por vocês tive que adquirir paciência,
Trabalhar muito mais,
Esperar o momento certo para viajar e,
Abrir mão de várias coisas,
Mesmo assim vocês são os maiores tesouros que posso ter na vida.**

Homenagem de um orgulhoso pai.

Meus agradecimentos

**À Deus,
Pela grande força que nos guia.**

**À minha orientadora
Profa. Dra. Suely Vilela,
Pela orientação durante o desenvolvimento deste trabalho, por acreditar
no meu potencial e principalmente pela confiança que deposita em todos
seus orientados.**

**Ao meu Co-orientador
Prof. Dr. Andreimar M. Soares
Pela orientação, por ensinar a escrever trabalhos em revistas científicas e
pela amizade sempre verdadeira.**

**Ao meu orientador da iniciação científica,
Prof. Dr. Paulo S. Pereira
Minha eterna gratidão ao professor que me ensinou como se faz uma bela
pesquisa científica.**

**À Dra. Adélia Cintra,
Pela amizade, colaboração e contribuição nas pesquisas desenvolvidas em
nosso laboratório.**

**Ao João José Franco
Pela grande amizade, uma pessoa de grande luz, além da grande
contribuição nas pesquisas realizadas nestes 6 anos de USP.**

**Aos AMIGOS que já pularam do barco
Luís Everton, Ellen, Jocivânia, Carol, Silvio e Mauricio, grandes
companheiros nos momentos bons e ruins.**

**Aos AMIGOS que ainda estão no barco
Gilmara, Elaine e Raquel, pessoas especiais que apareceram no momento
certo.**

**Ao Doutor Rodrigo G. Stabeli
Desde o início do projeto, trabalhando junto, e desenvolvendo maneiras
mais fáceis para isolar as LAAOs de alguns venenos.**

**Ao Prof. Dr. Marcos Fontes (UNESP)
Pela ajuda incansável para decifrar a estrutura da(s) bendita(s)
proteína(s).**

**Aos companheiros Aldo e Reinaldo,
Funcionários do biotério da FCFRP-USP, o Aldo partiu para outro
serviço, mas junto com Reinaldo, me ajudou imensamente, graças as
piadas as pesquisas eram mais descontraídas.**

**À todos os funcionários da FCFRP-USP
Pelo suporte e pelo apoio em todos os momentos.**

**Ao coordenador da Pós-Graduação em Toxicologia
Prof. Dr. Antonio C. dos Santos, pela ajuda e paciência com os prazos dos
alunos.**

**AOS MEUS PAIS
Pela dedicação e paciência com o filho caçula, e pensar que tiveram que se
apresentar na diretoria do colégio devido a bagunça e más notas do filhão
aqui.**

AOS MEUS IRMÃOS

José Alexandre e Kátia, pelas atitudes e exemplos deixados ao irmão caçula. Depois dessa correria, todos com vários deveres, logo poderemos tomar uma margosa juntos.

À MINHA ESPOSA

Pela paciência, compreensão e apoio em todos os momentos. Prometo que agora teremos aquela viagem que tanto sonhamos.

SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS	i
LISTA DE TABELAS	iii
LISTA DE FIGURAS	iv
RESUMO	vi
SUMMARY	vii
1. INTRODUÇÃO	01
1.1. Serpentes	02
1.2. Efeitos farmacológicos e tóxicos do veneno do gênero <i>Bothrops</i>	03
1.3. L-Aminoácido oxidase (LAAO)	07
2. OBJETIVOS	14
3. MATERIAL e MÉTODOS	16
3.1. Material	17
3.1.1. Veneno	17
3.1.2. Animais	17
3.1.3. Plasma	17
3.1.4. Outros reagentes	17
3.2. Métodos	17
3.2.1. Purificação da LAAO do veneno de <i>B. jararacussu</i>	17
3.2.1.1. Preparação da amostra	17
3.2.1.2. Filtração em Sephadex G-75	18
3.2.1.3. Cromatografia em Coluna de Afinidade	18
3.2.1.4. Cromatografia em Coluna hidrofóbica	19
3.2.1.5. Determinação quantitativa de proteína	19
3.2.1.6. Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS	19
3.2.1.7. Determinação do ponto isoeletrico (pI)	20
3.2.2. Sequenciamento automático da BjussuLAAO	21
3.2.3. Estudos de Biologia Molecular. Clonagem e Sequenciamento do cDNA da BjussuLAAO	22
3.2.4. Estudos de Modelagem Molecular	23
3.2.5. Ensaio sobre L-Aminoácido Oxidase	23
3.2.6. Indução de edema	23
3.2.7. Atividade miotóxica “in vivo”	24

3.2.8. Atividade hemorrágica -----	24
3.2.9. Atividade coagulante -----	25
3.2.10. Atividade fibrinogenolítica -----	25
3.2.10.1. Efeito de inibidores sintéticos -----	26
3.2.11. Atividade antitumoral -----	27
3.2.11.1. Linhagens tumorais humanas -----	27
3.2.11.2. Meios de cultura celular -----	27
3.2.11.3. Efeito citotóxico sobre células tumorais -----	28
3.2.12. Atividade bactericida -----	29
3.2.12.1. Preparo das bactérias Gram negativa e Gram positiva para avaliação da atividade bactericida da BjussuLAAO -----	29
3.2.12.2. Efeito citotóxico da BjussuLAAO sobre bactérias -----	30
3.2.13. Atividade leishmanicida -----	30
3.2.13.1. Condições de cultura de espécies de <i>Leishmania</i> -----	30
3.2.13.2. Efeito citotóxico da BjussuLAAO sobre <i>Leishmania</i> -----	31
3.2.14. Atividade tripanocida -----	32
 4. RESULTADOS -----	 34
 4.1. Purificação da LAAO do veneno de <i>B. jararacussu</i> -----	 35
4.1.1. Filtração em Gel de Sephadex G-75 -----	35
4.1.2. Cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose -----	36
4.1.3. Cromatografia hidrofóbica em Fenil-Sepharose -----	37
4.1.4. Eletroferese em Gel de Poliacrilamida com SDS -----	38
4.1.5. Determinação do ponto Isoelétrico (pI) -----	40
4.1.6. Estudos estruturais e Modelagem molecular da BjussuLAAO -----	41
 4.2. Avaliação funcional da BjussuLAAO -----	 52
4.2.1. Indução de edema -----	52
4.2.2. Atividade miotóxica 'in vivo' -----	53
4.2.3. Atividade hemorrágica -----	53
4.2.4. Atividade coagulante -----	55
4.2.5. Atividade fibrinogenolítica -----	56
4.2.6. Atividade antitumoral -----	59
4.2.7. Atividade bactericida -----	60
4.2.8. Atividade leishmanicida -----	61
4.2.9. Atividade tripanocida -----	62
 5. DISCUSSÃO -----	 63

6. CONCLUSÃO	73
---------------------	-----------

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	76
--------------------------------------	-----------

Lista de Abreviaturas

aa = aminoácido

AMBIC = Bicarbonato de amônio

ATZ = Aminoacilanilintiazolinona

BjussuLAAO = L-aminoácido oxidase de *Bothrops jararacussu*

BmooLAAO = L-aminoácido oxidase de *Bothrops moojeni*

CK = Creatina cinase

DCM = Dose Coagulante Mínima

DHM = Dose Hemorrágica Mínima

DP = Desvio Padrão

EDTA = Ácido etilenodiaminotetraacético

FAD = Flavina adenina dinucleotídeo

FCFRP = Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto

FMN = Flavina mononucleotídeo

FMRP = Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto

HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência

LAAO = L-aminoácido oxidase

Mr = Massa molecular relativa

MTX = Metotrexato

PAGE = Eletroforese em gel de poliacrilamida

PBS = Solução salina tamponada em fosfato

pI = Ponto Isoelétrico

PMSF = Fenilmetilsulfonilfluoreto

R.m.s = *Root mean square* (média da raiz quadrada)

SDS = Dodecil Sulfato de Sódio

Tris = Tris hidroximetilaminometano

LISTA DE TABELAS

TABELA 1. Avaliação da atividade fibrinogenolítica da enzima BjussuLAAO em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação -----	26
TABELA 2. Comparação das seqüências codificadoras de aminoácidos para as LAAOs de serpentes (“Codon Usage”) -----	48
TABELA 3. Matriz de identidade das seqüências nucleotídicas de LAAOs de serpentes -----	49
TABELA 4. Desvios R.m.s. obtidos da sobreposição entre três regiões principais da BmooLAAO-I com a estrutura da LAAO de <i>C. rhodostoma</i> . Dados calculados utilizando o programa “O” -----	51
TABELA 5. Desvios R.m.s. obtidos da sobreposição entre três regiões principais da BjussuLAAO com a estrutura da LAAO de <i>C. rhodostoma</i> . Dados calculados utilizando o programa “O” -----	51

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1. Desaminação estereoespecífica oxidativa de um substrato L-aminoácido catalisado por uma LAAO -----	08
FIGURA 2. Forma Tripomastigota encontrada em sangue circulante de hospedeiro infectado por <i>T. cruzi</i> -----	12
FIGURA 3. Filtração em Gel de Sephadex G-75 do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	36
FIGURA 4. Cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose da fração BJI do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	37
FIGURA 5. Cromatografia hidrofóbica em Fenil-Sepharose da sub-fração BSII do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> -----	38
FIGURA 6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida -----	39
FIGURA 7. Curva padrão de determinação da massa molecular -----	40
FIGURA 8. Curva padrão de determinação do pI-----	41
FIGURA 9. MEGA alinhamento múltiplo das seqüências de cDNAs de L-aminoácido oxidases -----	44
FIGURA 10 A. Modelagem Molecular da enzima BjussuLAAO -----	49
FIGURA 10 B. Modelagem demonstrando nos pontos vermelhos onde ocorrem as mutações entre a BjussuLAAO e a LAAO isolada do veneno de <i>C. rodhostoma</i> -----	49
FIGURA 11. Fenogramas da análise fenética de LAAOs de serpentes ----	50
FIGURA 12. Indução de edema em pata de camundongos pela toxina BjussuLAAO -----	52
FIGURA 13. Indução da miotoxicidade em camundongos pela toxina BjussuLAAO -----	53
FIGURA 14. Indução de hemorragia em camundongos pela toxina BjussuLAAO -----	54
FIGURA 15. Peles de camundongos após indução da hemorragia pelo VB e pela toxina BjussuLAAO -----	55

FIGURA 16. Indução da coagulação em plasma humano pela toxina BjussuLAAO -----	56
FIGURA 17. Atividade Fibrinogenolítica da toxina BjussuLAAO -----	57
FIGURA 18. Análise do efeito de inibidores na atividade fibrinogenolítica da BjussuLAAO -----	58
FIGURA 19. Atividade antitumoral da toxina BjussuLAAO sobre SKBR3 -----	59
FIGURA 20. Atividade bactericida da toxina BjussuLAAO sobre <i>E. coli</i> e <i>S. aureus</i> -----	60
FIGURA 21. Atividade leishmanicida induzida pela toxina BjussuLAAO --	61
FIGURA 22. Atividade tripanocida induzida pela toxina BjussuLAAO -----	62

RESUMO

Neste trabalho descrevemos o isolamento e a caracterização bioquímica, estrutural e funcional de uma L-aminoácido oxidase isolada do veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, proteína esta denominada BjussuLAAO. O isolamento foi realizado pela combinação de três etapas cromatográficas, utilizando filtração molecular em Sephadex G-75, seguida de cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose, seguida pela última etapa cromatográfica, realizada com interação hidrofóbica em Fenil-Sepharose. A BjussuLAAO é uma proteína com massa molecular de 61 kDa e pI 5,8, e apresentou alta similaridade sequencial com as LAAOs já isoladas dos venenos de serpentes. A enzima BjussuLAAO induziu edema apenas na maior dose (100 µg/animal), não apresentou atividade miotóxica, também não apresentou atividade hemorrágica, mesmo nas doses mais elevadas. A BjussuLAAO, demonstrou ter efeito coagulante e ação fibrinogenolítica e, mesmo utilizando inibidores de metaloproteases e serino proteases, continuou apresentando tal atividade, demonstrando assim não existir contaminantes destas classes de proteínas na amostra. As atividades mais interessantes do ponto de vista farmacológico, onde podemos visualizar a BjussuLAAO como um futuro fármaco, foram as atividades antitumoral, bactericida e antiparasitária. Esta apresentou, em baixas concentrações, citotoxicidade sobre células tumorais, ação leishmanicida e tripanocida, demonstrando assim ser uma substância candidata a fármaco multifuncional.

SUMMARY

In this research we described the isolation and biochemical, structural and functional characterization of an L-amino acid oxidase from *Bothrops jararacussu* venom, named BjussuLAAO. The purification was carried out through three chromatography steps, using a molecular filtration on Sephadex G-75, followed by an affinity chromatography on Benzamidine-Sepharose, and finally a hydrophobic chromatography on Phenyl-Sepharose. BjussuLAAO is a protein with a molecular mass of 61 kDa and pI 5.8. This protein showed high sequential similarity with other LAAOs from snake venoms. BjussuLAAO induced edema only in the highest dose (100 µg/animal), did not show any myotoxic or hemorrhagic activity. BjussuLAAO, showed clotting and fibrinogenolytic activity, even in the presence of metalloproteases and serino-proteases inhibitors. The more interesting pharmacological activities, where from we can look a future application, were the anti-tumoral, bactericide, leishmanicidal and tripanocidal actions. The enzyme displayed a bactericide effect too, showing to be a multifunctional drug.

Pedanios Dioscorides acompanha exército romano observando plantas que poderiam ser utilizadas como medicamentos

1 – INTRODUÇÃO

1.1 – Serpentes

No mundo existem aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, sendo que apenas 410 (13,7%) são consideradas venenosas e classificadas de acordo com suas características morfológicas em 4 famílias: *Viperidae*, *Elapidae*, *Hydrophyidae* e *Colubridae* (BARRAVIERA, 1994).

O veneno das serpentes peçonhentas é composto de substâncias simples e complexas, cuja proporção e características específicas variam entre as diferentes espécies conhecidas (TU, 1977). O veneno é uma mistura de várias toxinas, enzimas e peptídios, os quais induzem diversos efeitos tóxicos em suas vítimas. Apesar da função primária do veneno das serpentes ser a captura por suas presas, ele pode ser usado secundariamente como defesa, causando acidentes em seres humanos (AMARAL, 1977).

Os venenos das serpentes, especialmente da família *Viperidae*, contêm um grande número de proteínas farmacológica e bioquimicamente ativas, além de serem mais complexos que os pertencentes a outras famílias (DAL PAI & SANTO NETO, 1994). Cerca de 90 % do peso seco do veneno consiste de proteínas como metaloproteases, fosfolipases, L-aminoácido oxidases, entre outras. Os componentes não protéicos podem ser divididos em orgânicos e inorgânicos como aminoácidos livres, peptídios, nucleotídios, carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, ânions e cátions (BARRAVIERA & PEREIRA, 1999).

No Brasil 256 espécies foram catalogadas até o momento, sendo 69 venenosas (27%). Das 69 espécies de serpentes venenosas, 32 pertencem ao

gênero *Bothrops*; 29 ao gênero *Micrurus*; 6 ao gênero *Crotalus* e 2 ao gênero *Lachesis* (BARRAVIERA, 1994; BARRAVIERA & PEREIRA, 1999).

Anualmente ocorrem cerca de 20.000 acidentes ofídicos no Brasil, sendo que o número de óbitos dificilmente ultrapassa o número de 300 pessoas por ano. A maioria destes acidentes ocorrem nas áreas rurais e nas matas, acometendo principalmente, trabalhadores rurais. As serpentes atacam o homem, por se sentirem ameaçadas e o fazem no intuito de se defenderem.

O gênero *Bothrops*, pertencente à família *Viperidae*, compreende muitas espécies com distribuição que vai do México à Argentina, sendo responsável por cerca de 90% dos acidentes ofídicos ocorridos no Brasil (ROSENFELD, 1971).

Existem vários motivos para estudar e pesquisar venenos de serpentes. Os principais são: (1) isolamento de uma ou mais substâncias ativas no veneno que em baixas concentrações podem apresentar efeitos farmacológicos de grande interesse para a pesquisa de medicamentos, (2) melhor compreensão da função das substâncias isoladas do veneno de serpentes no envenenamento e (3) verificar se existe algum princípio ativo, sintético ou natural que possa inibir a ação do veneno e de algumas proteínas isoladas do mesmo.

1.2 – Efeitos farmacológicos e tóxicos do veneno do gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* ocorre em todo o Brasil. A ação local do veneno é hemorrágica, edematogênica e mionecrótica; a ação sistêmica é hipotensora, proteolítica e coagulante. Os sintomas das vítimas são dor, edema, rubor, equimose (formação de bolhas) e necrose no local da picada. A hipotensão e o choque periférico são observados em acidentes graves e são devidos à liberação

de mediadores vasoativos. Ocorre aumento do tempo de coagulação sangüínea. A vítima pode falecer por insuficiência renal aguda e/ou poderá ter infecção secundária por bactérias que são encontradas na flora bucal da serpente (AMARAL, 1977).

A mortalidade causada pelas espécies botrópicas foi estimada em 2,4% podendo atingir 8% quando as últimas não são tratadas devidamente (WHO, 1981). Nesses casos, o edema, a hemorragia e a necrose muscular são as mais sérias manifestações clínicas locais, causando incapacidade prolongada ou permanente do membro atingido. Alguns componentes isolados dos venenos do gênero *Bothrops*, tais como fatores hemorrágicos (MANDELBAUM *et al.*, 1976, 1984), enzimas que provocam distúrbios da coagulação sangüínea (ASSAKURA *et al.*, 1985; HOFMANN & BON, 1987) e miotoxinas (GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; GUTIÉRREZ & LOMONTE, 1989; HOMSI-BRANDEBURGO *et al.*, 1988) são responsáveis pelos sintomas clínicos do envenenamento.

A hemorragia, uma das mais evidentes atividades biológicas dos venenos de serpentes da família Viperidae, é a mais relevante patofisiologia do envenenamento (BJARNASSON & FOX, 1994). A medição do halo hemorrágico obtido após a injeção intradérmica (i.d) do veneno em ratos ou camundongos (KONDO *et al.*, 1960; OHSAKA *et al.*, 1966) é específico, rápido e reprodutível. Os danos hemorrágicos locais são rápidos, a patogênese do veneno é complexa, envolvendo ação combinada de metaloproteases e outros componentes existentes no veneno bruto (GUTIÉRREZ *et al.*, 1995).

A hemorragia é causada pela ação de metaloproteases que provavelmente degradam colágeno e outros componentes da lâmina basal dos vasos capilares.

Como consequência os capilares são rompidos, promovendo equimoses e sangramentos. O veneno possui uma ação sobre os fatores de coagulação, alterando o tempo de coagulação (TC). Os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* diminuem o tempo de coagulação, por atuarem sobre fatores da cascata de coagulação, sobre a trombina ou sobre o fibrinogênio diretamente (GUTIÉRREZ & CHAVES, 1980; GUTIÉRREZ *et al.*, 1984; QUEIROZ & PETTA, 1984).

Um grande número de metaloproteases foram isoladas dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*, como *B. atrox*, *B. moojeni* (ITOH *et al.*, 1987) e *B. jararaca* (NISHIDA *et al.*, 1994). O veneno da serpente *B. jararacussu* não apresenta hemorragia tão intensa como os venenos de outras serpentes botrópicas. Devido a este fato, pesquisas envolvendo veneno de *B. jararacussu* com atividade hemorrágica não são muito explorados, mas o veneno não deixa de demonstrar este dano local no tecido. Recentemente, Mazzi e colaboradores isolaram e caracterizaram uma metaloprotease do veneno de *B. jararacussu* comprovando que esta metaloprotease participa do efeito hemorrágico induzido pelo veneno desta serpente (MAZZI *et al.*, 2004, 2006).

A ação miotóxica provocada pelos venenos ou miotoxinas isoladas das serpentes do gênero *Bothrops* pode ser demonstrada através de alterações histológicas e de testes laboratoriais, pelo perfil enzimático de liberação de enzimas como, CK (creatina cinase) e LDH (lactato desidrogenase) (BATINA *et al.*, 1997).

Gutiérrez *et al.* (1991) e Dos Santos *et al.* (1992) estudaram a patogênese da mionecrose induzida pelo veneno de *B. jararacussu* e pelas miotoxinas

bothropstoxina I e II (BthTX-I e II), em camundongos e observaram que estas proteínas induzem um rápido aumento dos níveis de CK plasmático, atingindo níveis máximos de liberação em um tempo de 3 h, ocorrendo diminuição desses níveis nos tempos seguintes. Observações histopatológicas e ultraestruturais indicaram que a BthTX-II afeta as fibras dos músculos esqueléticos por alterarem primeiramente a membrana plasmática. Enquanto o aumento dos níveis de CK apresentam uma boa correlação com a destruição do tecido muscular. Quando se utilizam proteínas purificadas, os efeitos com o veneno bruto precisam de interpretações mais cuidadosas, pelo fato do veneno apresentar vários constituintes com efeitos funcionais adversos (MEBS *et al.*, 1983).

O edema local é outra típica manifestação de envenenamento botrópico, independente da via de inoculação. O edema é acompanhado de dor, que pode variar de discreta a intensa. Isto é causado, provavelmente pela combinação de elementos tais como, efeito direto do veneno sobre os vasos e liberação de mediadores endógenos como, histamina, cininas e prostaglandinas devido à ação dos componentes dos venenos sobre os mastócitos, cininogênios e fosfolípídeos, respectivamente. Em alguns casos, o edema é responsável pela elevação da pressão intersticial hidrostática nos compartimentos musculares. Além da sua ação sobre células musculares e microvasculatura, o veneno botrópico também afeta artérias, causando trombose e lesão das paredes arteriais. Lesão arterial causa isquemia e necrose futura. Além disso, esse veneno afeta nervos intramusculares (BARRAVIEIRA, 1994).

LANDUCCI *et al.* (1998) demonstraram que a formação do edema é dependente da ativação de células mastocitárias, como havia sido observado com

outras fosfolipases A₂ (CIRINO *et al.*, 1989; WANG & TENG, 1990; MORENO *et al.*, 1992). Assim os resultados sugerem que a hidrólise enzimática de fosfolípídeos pela fosfolipase A₂ não é essencial para a formação do edema.

As principais toxinas do veneno de *Bothrops jararacussu* são as fosfolipases A₂, BthTX-I e II. Homsí-Brandeburgo *et al.* (1988) foram os primeiros a isolar e caracterizar bioquimicamente estas proteínas, responsáveis pela necrose muscular. A BthTX-I é uma proteína básica de cadeia única, sem atividade catalítica conhecida, com Mr de aproximadamente 14.000. A BthTX-II é uma miotoxina com baixa atividade fosfolipásica sobre lecitina de gema de ovo.

O veneno da serpente *B. jararacussu* apresenta além de fosfolipases básicas, outras enzimas como: proteases (serino e metaloproteases), lectina, e PLA₂ ácida (BORTOLETO *et al.*, 2002; DE CARVALHO *et al.*, 2002; ANDRIÃO-ESCARSO *et al.*, 2000; MAZZI *et al.*, 2004; SANT'ANA *et al.*, 2005).

1.3 – L-aminoácido oxidase (LAAO)

L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoproteínas diméricas, foi primeiramente descrita em 1977 (ZELLER, 1977). Estas proteínas contêm ligações não covalentes com o FAD como co-fator e estão presentes nos venenos de várias espécies de serpentes (CURTI *et al.*, 1992).

As LAAOs purificadas de venenos são geralmente glicoproteínas (3-4%) homodiméricas ácidas ou básicas (pI = 4,4 – 8,5), FMN e FAD como co-fatores (~ 2 mol/mol), que têm massa molecular de 120 - 150 kDa na forma nativa e 55 – 66 kDa em sua forma monomérica (SOUZA *et al.*, 1999; PONNUDURAI *et al.*, 1994;

TAN & SWAMINATHAN, 1992; TAN & SAIFUDDIN, 1989; SHAHAM & BDOLAH, 1973; TORII *et al.*, 1997; AHN *et al.*, 1997; LI *et al.*, 1994; ABE *et al.*, 1998).

A LAAO catalisa a desaminação oxidativa de um substrato L-aminoácido para um α -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio (Fig. 1).

Figura 1. Desaminação estereoespecífica oxidativa de um substrato L-aminoácido catalisado por uma LAAO.

Essa enzima exibe uma preferência para aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos incluindo, fenilalanina, triptofano, tirosina e leucina. Contudo o mecanismo de toxicidade induzido pelas LAAOs de venenos ainda é desconhecido. Tem se demonstrado que estas enzimas isoladas de *Crotalus adamanteus* e *C. atrox* podem se associar especificamente com células endoteliais de mamíferos (SUHR & KIM, 1999; DU & CLEMETSON, 2002) possivelmente devido ao aumento na produção de peróxido de hidrogênio.

Essa proteína apresenta significativa similaridade com a proteína indutora de interleucina-4 de camundongos (RAYBEKAS & MASSEY, 1998), com a monoamino oxidase (MAO) e pode estar envolvida na resposta da inflamação alérgica (CHU & PAUL, 1997).

Os melhores estudos dessas flavoproteínas são as pesquisas envolvendo espécies de serpentes, principalmente do gênero *Calosellasma*, onde essa enzima está presente em altas concentrações nos venenos e participa também dos efeitos tóxicos (LI *et al.*, 1994; TORII *et al.*, 1997).

As LAAOs apresentam peculiaridades para cada veneno de serpente. Por exemplo a enzima purificada do veneno de *C. adamanteus* apresenta inativação reversível, quando congelada (-20°C) (CURTI *et al.*, 1968, COLES *et al.*, 1977) e, quando reaquecida novamente (37°C), em pH 5, ela é renaturada e volta a ter atividade (COLES *et al.*, 1977).

A purificação de LAAOs de venenos de serpentes tem sido descrita por vários grupos de pesquisadores, sendo que enzimas de diferentes origens exibem diferentes especificidades, estabilidades e diversas atividades biológicas e tóxicas (DU & CLEMETSON, 2002).

Os grupos que descreveram metodologias para a purificação das LAAOs do veneno de serpentes, basicamente, utilizaram resinas de exclusão molecular, troca iônica, afinidade e hidrofóbica. Takatsuka *et al.* (2001) iniciaram a purificação, passando o veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* em uma resina de troca iônica, enquanto Sakurai *et al* (2001) iniciaram a purificação filtrando o veneno de *Naja naja kaouthia* em uma resina de exclusão molecular.

Pesquisas com a estrutura das LAAOs estão sendo realizadas constantemente. Vários trabalhos descrevem a seqüência N-terminal e apresentam a seqüência do cDNA (TAKATSUKA *et al.*, 2001; ZHANG *et al.*, 2003; MACHEROUX *et al.*, 2001) mas, até o momento, apenas a LAAO isolada do veneno de *C. rodhostoma* teve sua estrutura tridimensional obtida por

cristalografia. A maioria das LAAOs isoladas dos venenos de serpentes apresentam grande similaridade, como, massa molecular, pI e sequência N-terminal. A LAAO isolada do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii* apresentou 90% de similaridade com a sequência N-terminal da LAAO isolada do veneno de *C. atrox* (TORII *et al.*, 1997) e 88% com *C. adamanteus* (RAIBEKAS *et al.*, 1998). Outro fator estrutural é a presença do ligante FAD. O grupo prostético FAD faz grandes interações com os átomos da proteína. Este ligante é inclusive considerado um domínio da proteína LAAO.

O mecanismo de ação desta enzima ainda é muito incerto. Contudo, alguns trabalhos descrevem amplos efeitos biológicos e farmacológicos, como: indução de apoptose (TORII *et al.*, 1997; MASUDA *et al.*, 1997; SUHR & KIM, 1996), citotoxicidade (SOUZA *et al.*, 1999; AHN *et al.*, 1997), indução ou inibição da agregação plaquetária (LI *et al.*, 1994), hemorragia (SAKURAI *et al.*, 2003), hemólise (ABE *et al.*, 1998), edema (TAN & CHOY, 1994), efeitos bactericida (STILES *et al.*, 1991) e leishmanicida (TEMPONE *et al.*, 2001). Muitos dos efeitos biológicos de LAAOs são creditados aos efeitos secundários do peróxido de hidrogênio (H_2O_2), produzido durante a reação enzimática (TORII *et al.*, 1997 LI *et al.*, 1994; TAN & CHOY, 1994; SUHR & KIM, 1999).

Trabalhos científicos recentes tentam entender o mecanismo de ação tóxica e farmacológica de algumas L-aminoácido oxidases. Sakurai *et al.* (2003) apresentaram resultados interessantes com a LAAO isolada do veneno de *Agkistrodon halys blomhoffii*, onde a enzima atua como anticoagulante agindo como inibidor seletivo do fator IX da cascata de coagulação. Zhang *et al.* (2003) trabalharam na caracterização molecular da LAAO isolada do veneno de

Trimeresurus stejnegeri e também foram os pioneiros nos estudos envolvendo LAAO com potencial antiviral. A LAAO isolada por Zhang *et al.* (2003), designada TSV-LAO apresentou ação antiHIV e demonstra mais um potencial desta enzima como fármaco. Uma nova LAAO foi isolada do veneno da serpente *Crotalus durissus cascavella* (TOYAMA *et al.*, 2006), apresentando atividade leishmanicida bastante eficiente, e também apresentando indução da agregação plaquetária e ação bactericida. Estudos também recentes envolveram uma LAAO isolada do veneno de *Vipera berus berus*, onde Samel *et al.* (2006) verificaram os efeitos de indução da agregação plaquetária e indução de apoptose pela fragmentação do DNA.

Até o momento, poucas LAAOs foram isoladas do gênero *Bothrops*, sendo exploradas as LAAOs das espécies sul americanas *B. moojeni*, a qual apresenta efeito anti-*Leishmania* (TEMPONE *et al.*, 2001), *B. alternatus* com efeito bactericida (STABELI *et al.*, 2004) e *B. pirajai* com atividade bactericida e antitumoral (IZIDORO *et al.*, 2006).

Nos estudos com venenos de serpentes e com toxinas isoladas destes, temos algumas atividades farmacológicas avaliadas em todas as pesquisas, por exemplo, edema, hemorragia, coagulação, atividade fibrinogenolítica, miotoxicidade, entre outras. Mas algumas atividades são pouco exploradas com venenos e toxinas isolados de animais peçonhentos, como por exemplo, a ação antiparasitária. Pesquisas recentes apresentaram alguns dados, principalmente com venenos de serpentes, que atuam sobre parasitas como os pertencentes aos gêneros *Leishmania* e *Trypanosoma*, mas é muito pouco, devido à quantidade de toxinas isoladas dos venenos de serpentes.

Os nove gêneros da Família Trypanosomatidae são parasitas obrigatórios; entre os hospedeiros encontramos protozoários, plantas, anelídeos, aracnídeos, insetos, peixes, répteis, anfíbios, aves e mamíferos. Dois gêneros de Trypanosomatidae apresentam espécies de importância médica (*Leishmania* e *Trypanosoma*). Conseqüentemente, estes são os mais estudados nas pesquisas básica e aplicada (LANA & TAFURI, 1997).

Os tripanosomatídeos apresentam uma alternância de formas celulares em seus ciclos biológicos, graças ao complexo fenômeno da diferenciação celular. Esse pleomorfismo é particularmente evidente na transição entre hospedeiros vertebrados e invertebrados, mas também pode ocorrer dentro de um mesmo hospedeiro, como uma adaptação fisiológica ao ambiente específico ou em antecipação à próxima etapa do ciclo. As seguintes formas celulares são: **Promastigota, Opisthomastigota, Epimastigota, Tripomastigota, Coanomastigota, Amastigota, Paramastigota e Esferomastigota.**

Figura 2. Forma tripomastigota encontrada em sangue circulante de hospedeiro infectado por *T. cruzi*.

As LAAOs apresentam ação antiparasitária, principalmente contra *Leishmania* (TEMPONE *et al.*, 2001), mas esta é uma atividade que ainda precisa ser bastante explorada.

De forma geral, as LAAOs apresentam várias atividades funcionais. Recentemente foi publicado um artigo que descreve os efeitos das LAAOs isoladas dos venenos de serpentes demonstrando os mesmos efeitos farmacológicos (bactericida e antitumoral) com a LAAO isolada da “lebre” do mar (*Aplysia californica*), apresentando efeitos bastante similares (BARSBY, 2006).

Tradicionalmente, pequenas moléculas dominam os estudos de química. Contudo, proteínas isoladas de venenos de animais peçonhentos, apresentam várias ações tóxicas e farmacológicas. As LAAOs estão revelando, cada vez mais efeitos biológicos, demonstrando o grande potencial dessas proteínas. Estudos de caracterização estrutural e funcional dessa classe de enzimas serão muito importantes, tanto do ponto de vista de compreensão do seu mecanismo de ação, quanto de sua potencial aplicação biotecnológica na clínica-farmacêutica.

**Mithridates VI estudou a “arte do envenenamento”,
mas também realizou estudos sobre
prevenção do envenenamento**

2 – OBJETIVOS

O presente trabalho teve por objetivo geral, isolar uma L-aminoácido oxidase (BjussuLAAO) presente no veneno da serpente *Bothrops jararacussu*, caracteriza-lá bioquimicamente e farmacologicamente, visando um novo fármaco modelo com possibilidades de se tornar um produto na indústria farmacêutica.

Para atingir o presente objetivo, foram realizadas as seguintes etapas:

- 1. Purificação da LAAO do veneno de *Bothrops jararacussu* pela associação de três passos cromatográficos: filtração em Sephadex G-75; afinidade em benzamidina-sepharose e hidrofobicidade em fenil-sepharose.
- 2. Caracterização bioquímica da enzima LAAO, determinando a massa molecular relativa (Mr), o ponto isoelétrico (PI) e a sequência N-terminal.
- 3. Avaliação dos efeitos tóxicos (edema, miotoxicidade e citotoxicidade) e farmacológicos (indução de hemorragia, atividade fibrinogenolítica e ação coagulante) da LAAO.
- 4. Avaliação do potencial biotecnológico da LAAO através dos efeitos bactericida, leishmanicida, tripanocida e antitumoral.
- 5. Clonagem e seqüenciamento do cDNA da BjussuLAAO.

Galeno – Experimento com novas formulações

3 – MATERIAL E MÉTODOS

3.1 – Material

3.1.1 – Veneno

Veneno bruto liofilizado de *B. jararacussu*, adquirido do Instituto Butantan de São Paulo.

3.1.2 – Animais

Camundongos machos, linhagem suíça com peso de 18-22 g, procedentes do Biotério Central do Campus de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo (Comissão de ética protocolo nº 05.1.819.53.7).

3.1.3 – Plasma

Plasma humano procedente de voluntários do Hemocentro da cidade de Ribeirão Preto (Comissão de ética protocolo nº 05.1.819.53.7).

3.1.4 – Reagentes

Os reagentes utilizados foram de grau analítico e estão descritos na metodologia.

3.2 – Métodos

3.2.1 - Purificação da LAAO do veneno de *B. jararacussu*

3.2.1.1 – Preparação da amostra

Amostras de 1.000 mg do veneno bruto, liofilizado de *B. jararacussu*, foram suspensas em 5,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M, pH 8,1

e centrifugada a 12.000 x g durante 10 minutos. Alíquotas do sobrenadante foram retiradas para dosagem de proteínas pelo método do microbiureto (ITZHAKI & GILL, 1964) e leitura da absorbância em 280 nm.

3.2.1.2 – Filtração em Sephadex G-75

O sobrenadante límpido obtido anteriormente foi aplicado em uma coluna de exclusão molecular Gel Sephadex G-75 (4,0 x 90,0 cm) equilibrada com bicarbonato de amônio 0,05 M pH 8,1, com fluxo de 30 mL/h, coletando-se 10 mL/tubo. Foram utilizados 2 L da solução tampão para equilibrar a coluna e mais 2 L da solução tampão para a eluição de todo o veneno. A absorbância das frações coletadas foram determinadas em 280 nm, em espectrofotômetro Beckman DU-640. A primeira fração eluída, BJI, ativa sobre a L-leucina, foi concentrado por ultrafiltração (Amicon, membrana de 30.000 Da). As demais frações foram reunidas e liofilizadas.

3.2.1.3 – Cromatografia em coluna de Afinidade

Primeiramente foi preparada a resina Benzamidina-Sepharose, que foi lavada com NaOH 0,5 M (100 mL) e depois lavada com água destilada até pH neutro (100 mL). A fração BJI (7 mg/mL) foi cromatografada nesta coluna de afinidade (1,8 x 4,5 cm) coletando-se 5 mL/tubo, fornecendo a primeira fração (BSI) na eluição com água destilada (50 mL). Em seguida aplicou-se o tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,8 (50 mL) para a obtenção da segunda fração (BSII - contendo a BjussuLAAO). Após a eluição da segunda fração, aplicou-se solução glicina 20 mM pH 3,2 (80 mL), para a eluição da terceira e última fração (BSIII).

Novamente uma fração de atividade sobre a L-leucina foi concentrada por ultrafiltração AMICON em membrana de 10.000 Da.

3.2.1.4 – Cromatografia em coluna hidrofóbica

Primeiramente foi preparada a resina Fenil-Sepharose, que foi lavada com água destilada (100 mL) e depois equilibrada com solução tampão Tris-base em pH 8,6 contendo sulfato de amônio 2 M (100 mL). Em seguida, aplicou-se a amostra BSII (4 mg/mL), onde foram coletados 2,5 mL/tubo em gradiente salino decrescente (sulfato de amônio 2 – 0,5 M) a cada dez tubos coletados. Em seguida, eluiu-se com tampão Tris-base em pH 8,6 e em água destilada para a limpeza da coluna, sendo recuperado 1 pico com atividade sobre a L-leucina que foi demonstrado ser a enzima BjussuLAAO pura, do veneno bruto de *B. jararacussu*.

3.2.1.5 –Determinação Quantitativa de Proteína

A quantificação de proteína foi realizada pelo método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI & GILL (1964). As amostras foram convenientemente diluídas e a dosagem realizada, utilizando-se soro albumina bovina como padrão.

3.2.1.6 –Eletroforese em gel de poliacrilamida com SDS

A BjussuLAAO foi submetida à eletroforese em gel de poliacrilamida, segundo LAEMMLI (1970). No sistema eletroforético foi utilizado um gel de concentração (gel superior) contendo acrilamida a 5% em Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8 e SDS a 0,1% e um gel de separação (gel inferior) contendo acrilamida a 12% em Tris-HCl 2,0 M; pH 8,8 e SDS a 0,1%. Os géis foram polimerizados em placas de

vidro (10,5 x 10 mm), as quais foram acopladas em um reservatório contendo tampão Tris (0,036 M), glicina (0,072 M) e SDS a 0,1% pH 8,3. Foram avaliados a determinação da massa molecular, critério de pureza e análises fibrinogenolíticas. As amostras foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625 M, pH 6,8 contendo glicerol, β -mercaptoetanol 5% (v/v), SDS (2%) e azul de bromofenol a 0,001%. As soluções foram aquecidas a 100°C por 5 minutos e aplicadas nos poços, em um volume final de 15 μ L. Os padrões de peso molecular utilizados foram: fosforilase b (94.000), soro albumina bovina (67.000), ovoalbumina (43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactalbumina (14.400).

A eletroforese foi realizada utilizando uma fonte de energia programada com uma corrente de 10 mA constante do início ao fim da corrida. As proteínas foram coradas com uma solução de Coomassie Blue R-250 em água e metanol, na proporção 1:1 (v/v). O gel foi descorado com uma solução de ácido acético a 10%, até a visualização das bandas de proteínas.

A mobilidade eletroforética relativa de cada banda foi determinada em centímetros e a massa molecular relativa foi calculada, relacionando-se a mobilidade eletroforética com o logaritmo do peso molecular do padrão.

3.2.1.7 –Determinação do Ponto Isoelétrico (pI)

O ponto isoelétrico foi determinado segundo método descrito pelo fabricante, através do sistema ZOOM IPGRunner Invitrogen.

1º Passo

A enzima BjussuLAAO foi reidratada com 200 μ L de tampão (8,0 M de uréia, 2% CHAPS, 0,5% anfólitos “ZOOM Carrier Ampholytes Invitrogen” pH 3-10,

0,02% Azul de bromofenol e 20mM de DTT) e foi aplicada em fitas de gradiente com pH imobilizado (fitas) que foram colocados nos poços do cassete, ficando em repouso durante 16 horas a temperatura ambiente. Na cuba de eletroforese bidimensional, foram adicionados 600 mL de água destilada. Os eletrodos foram adaptados e a fonte foi ajustada para 500 V, com duração da corrida de 4 horas com voltagem constante.

2º Passo

A fita foi retirada e deixada durante 15 minutos sob leve agitação em uma solução contendo NuPAGE 1X + NuPAGE 10X (Invitrogen). A solução foi descartada sendo adicionada outra solução, contendo NuPAGE por mais 15 minutos.

A fita foi colocada em um gel de poliacrilamida a 12% na presença de SDS e coberto com solução de agarose a 0,5% em tampão de corrida Tris-Glicina pH 8,4, sendo utilizados 200 V durante 2 horas. Após a corrida, o gel foi corado por 30 minutos em “Comassie Brilliant Blue” e descorado em ácido acético a 10%.

3.2.2 – Seqüenciamento Automático da BjussuLAAO

O seqüenciamento da BjussuLAAO foi realizado em um microseqüenciador automático de proteínas Procise modelo 491, da Applied Biosystem, que utiliza o processo químico de seqüenciamento por clivagem do N-terminal, derivado do método desenvolvido por EDMAN & BEGG (1967). Este processo tem como princípio a reativação específica do terminal amínico da proteína, com conversão ao PITC e a remoção seletiva deste terminal amínico por uma ciclização intramolecular, enquanto que o restante da molécula permanece intacto. Cada ciclo da degradação remove seqüencialmente um aminoácido do terminal amínico

do polipeptídeo. O seqüenciamento automático da BjussuLAAO foi realizado em colaboração com o Laboratório de Química de Proteínas da FMRP-USP, sob supervisão do Prof. Dr. Lewis Joel Greene.

3.2.3 – Estudos de Biologia Molecular: Clonagem e Seqüenciamento do cDNA da BjussuLAAO

A seqüência completa da LAAO isolada a partir das bibliotecas de cDNA do veneno da glândula de *Bothrops jararacussu* (KASHIMA et al., 2004), foi clonada em pUC18/SmaI, utilizando-se os sítios de restrição BamHI e NdeI nas extremidades 5' e 3', respectivamente. Foi utilizada como célula hospedeira *E. coli* DH5 α [supE44 Δ lacU169(ϕ 80lacZ Δ M150hsdR17relaA1 gyrA96 thi-1 recA1)]. Os clones recombinantes contendo cDNA foram analisados por meio de seqüenciamento direto dos plasmídeos recombinantes utilizando-se os primers universais M13 “sense” e “antisense”, e reagentes do kit de seqüenciamento *ABI Prism® Big Dye™ Terminator cycle sequencing ready reaction kit* e o equipamento *ABI 377 Sequencer* (Applied Biosystems). O protocolo de seqüenciamento foi o recomendado pelo fabricante. Após a eliminação da região correspondente ao vetor os eletroferogramas foram analisados com auxílio do programa *Sequencher version 3.1* (Gene Codes Corporation). Estes experimentos foram realizados em colaboração com a Profa. Dra. Suzelei de C. França - UNAERP. As seqüências analisadas foram então identificadas por comparação com seqüências depositadas no GenBank (NCBI), mediante alinhamentos locais (BLASTN), com seqüências de nucleotídeos. A análise comparativa do alinhamento múltiplo da

seqüência de aminoácidos deduzida da BjussuLAAO com outras LAAOs de venenos de serpentes foi realizada pelo programa CLUSTAL X 1.8.

3.2.4 - Estudos de Modelagem Molecular

A seqüência de aminoácidos deduzida a partir do cDNA da BjussuLAAO, foi modelada pela comparação com a estrutura cristalográfica da LAAO de *Calloselasma rhodostoma* (PDB 1F8S) (PAWELEK *et al.*, 2000) e apresentadas na forma RIBBON. Estes estudos foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Marcos R. M. Fontes (UNESP – Botucatu)

3.2.5 – Ensaio sobre L-aminoácido oxidase

A atividade de LAAO foi determinada em tampão Tris-HCl 0,1M; pH 7,2 à 25°C utilizando uma enzima conjugada no ensaio. Este ensaio, gera peróxido de hidrogênio pela desaminação oxidativa da L-leucina pela LAAO. Foi utilizado peroxidase de rabanete para oxidar a o-fenilenediamina. O radical cátion foi espectrofotometricamente monitorado no comprimento de onda de 490nm, utilizando 20mL de mistura contendo 10 µL de peroxidase de rabanete (1mg.mL⁻¹), 200 µL de uma solução de o-fenilenediamina (10 mg/mL metanol) e 20 mg de L-leucina. A reação foi realizada com 0,5 mL da solução ensaio com adição de 10 µL de LAAO e interrompida pela adição de 0,5 mL de ácido cítrico a 10% (m/v) (PESSATTI *et al.*, 1995).

3.2.6 – Indução de edema

Para esta atividade foram utilizados camundongos machos, linhagem suíça (18 – 22 g), os quais foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais,

que ficaram em repouso para adaptação por 24 h. O edema foi induzido através de injeção intradérmica da BjussuLAAO, na região sub-plantar da pata posterior direita, sendo avaliado com um paquímetro de baixa pressão 0,01 mm (MYTUTOYO, Japão) nos intervalos de 0; 0,5; 1; 2; 4; 6; 24 e 48 h após a injeção. A enzima BjussuLAAO foi aplicada nas doses de 5, 10, 25, 50 e 100 µg/animal. Também foi utilizado um grupo controle apenas com PBS. O edema foi calculado pela porcentagem de aumento do tamanho da pata do camundongo em relação ao tamanho inicial da pata (antes da aplicação).

3.2.7 - Atividade miotóxica “in vivo”

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, e ficaram em repouso para adaptação por 24 h. A enzima BjussuLAAO foi aplicada nas doses de 25, 50 e 100 µg/animal. Foram utilizados grupos controle, um grupo apenas com PBS e outro grupo tratado com BthTX-I na dose de 50 µg/animal. A miotoxicidade foi induzida através de injeção intramuscular no músculo gastrocnemius direito, sendo o sangue colhido pela veia caudal em capilares heparinizados 3 horas após a injeção. O sangue foi centrifugado a 12.000 x g por 6 min e o plasma obtido foi utilizado para dosagem de creatina cinase (CK) (SOARES *et al.*, 2000), em um espectrofotômetro Beckman DU 640, em absorbância de 340 nm, utilizando Kit CK-UV Sigma Chem. Co.

3.2.8 - Atividade hemorrágica

Os camundongos foram distribuídos aleatoriamente em grupos de 5 animais, e ficaram em repouso para adaptação por 24 h. A enzima BjussuLAAO

foi aplicada nas doses de 50, 100 e 200 $\mu\text{g}/\text{animal}$. Foram utilizados grupos controle, um apenas com PBS e outro tratado com veneno bruto (VB) de *B. jararacussu*, na dose de 20 $\mu\text{g}/\text{animal}$. A hemorragia foi induzida através de injeção intradérmica na região dorsal, sendo a pele retirada 3 horas após a injeção. O halo hemorrágico formado foi medido em milímetros (mm) segundo método descrito por KONDO *et al.* (1960).

3.2.9 – Atividade coagulante

A atividade coagulante foi realizada utilizando plasma humano (200 μL), CaCl_2 (0,25 mM) e BjussuLAAO em diferentes concentrações (0,02; 0,06; 0,125; 0,18; 0,25; 0,5 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). O plasma foi colocado em um tubo de ensaio em banho-Maria a 37° C por 5 min. Após este intervalo de tempo foram adicionados 25 μL das soluções em diferentes concentrações contendo BjussuLAAO. Para teste controle do plasma não adicionou-se a enzima mas apenas 25 μL de CaCl_2 , onde o plasma deve coagular no intervalo de 3 a 6 min. A dose coagulante mínima (DCM) é a quantidade mínima de enzima que coagula o plasma no tempo de 1 min. (NAHAS *et al.*, 1983).

3.2.10 – Atividade fibrinogenolítica

A atividade proteolítica sobre fibrinogênio foi avaliada, reagindo a solução de fibrinogênio (2 mg/mL) em 20 μL de PBS com a enzima BjussuLAAO a 37° C por 2 h. A solução de fibrinogênio bovino (10 μL) foi misturada com a enzima BjussuLAAO em diferentes massas (0,5; 1,0; 2,0; 4,0; 8,0; 16 e 32 μg). A reação foi interrompida com

uma solução contendo glicerol (10% v/v), β -mercaptoetanol (10% v/v), SDS (2% v/v) e azul de bromofenol (0,05% p/v). A degradação do fibrinogênio foi demonstrada em gel de poliacrilamida (12%) SDS-PAGE, realizada como descrita no item 3.2.1.6. Outro teste realizado foi a incubação da enzima BjussuLAAO com fibrinogênio em diferentes tempos de reação (0,25 – 24 h) (TABELA 1).

TABELA 1. Avaliação da atividade fibrinogenolítica da enzima BjussuLAAO em diferentes concentrações e diferentes tempos de incubação (verificar tabela com os resultados das figuras 16 A e 16 B).

GRUPOS	BjussuLAAO (4 μ g)	
	BjussuLAAO (μ g)	Tempo de incubação em horas
*1	-	-
2	1	0,25
3	2	0,5
4	4	1
5	8	2
6	16	4
7	32	8
8	-	24

* Controle – Padrão de fibrinogênio (20 μ g / 10 μ L).

3.2.10.1 – Efeito de inibidores sintéticos

O efeito de inibidores sintéticos (EDTA, EGTA, PMSF, leupeptina, aprotinina, fenantrolina e β -mercaptoetanol) sobre a BjussuLAAO foi avaliado

segundo a metodologia descrita por Rodrigues *et al.* (2000). Primeiro incubaram-se 10 μ L da mistura reacional contendo PBS + BjussuLAAO (4 μ g) com 10 μ L dos respectivos inibidores a 0,02M, por 15 min. Após este tempo a mistura foi incubada com 10 μ L de fibrinogênio (2 μ g/ μ L PBS), por 30 min. Determinou-se a atividade fibrinogenolítica em gel de poliacrilamida, de acordo com a metodologia descrita anteriormente (item 3.2.10).

3.2.11 – Atividade antitumoral

3.2.11.1 - Linhagens tumorais humanas

Em nosso trabalho, utilizamos a linhagem tumoral humana SK-BR-3 (Adenocarcinoma de mama). Esta linhagem foi obtida da Coleção Americana de Cultura de Células (ATCC, *American Type Culture Collection*, Rockville, MD, USA). A linhagem tumoral é mantida em criopreservação em nitrogênio líquido a -190°C em solução de congelamento que consiste em: meio RPMI 1640, suplementado com solução contendo 10% de dimetilsulfóxido (DMSO) e 90% de soro bovino fetal. Para os ensaios de atividade citotóxica, essas células foram descongeladas e expandidas em frascos de cultura celular, à temperatura de 37°C, em estufa incubadora úmida contendo 95% de ar e 5% de CO₂.

3.2.11.2 - Meios de Cultura Celular

Para a manutenção da linhagem de células tumoral humana, dissolução de toxinas animais e realização dos ensaios de atividade antitumoral, utilizamos o meio RPMI 1640 suplementado com 10% de soro bovino fetal, 20 mM de L-glutamina, 7,5%

de bicarbonato de sódio e 10 µg/mL de gentamicina (meio RPMI completo). Este meio foi preparado na hora do uso e esterilizado por filtração em membranas de 0,22 µm.

3.2.11.3 – Efeito citotóxico sobre células tumorais

Para esta finalidade, as linhagens tumorais em crescimento logarítmico foram removidas dos frascos de cultura celular pela adição de 1 mL de tripsina a 0,5%, em meio RPMI. Os frascos foram então mantidos sob agitação manual por aproximadamente 60 segundos. Em seguida, foram adicionados 10 mL de meio RPMI completo para neutralizar a tripsina, transferidas para tubos plásticos de 50 mL, lavadas 3 vezes através da centrifugação a 1000 rpm / 10 min. em meio completo, contadas em câmara de Neubauer e ressuspensas à concentração final de 10^6 células / mL em meio completo. As células foram então adicionadas em placas de 96 poços nas concentrações apropriadas (10^5 células/poço) e mantidas em estufa umidificada contendo 5% de CO₂ e 95% de ar por 24 horas. Ao findar deste período às células tumorais foram incubadas na presença ou na ausência de BjussuLAAO ou metotrexato (1 – 0,01 mg/mL) por 24 horas.

Para avaliar a atividade citotóxica da BjussuLAAO utilizamos o método colorimétrico de citotoxicidade (MOSMANN, 1983) que foi adaptado pelo nosso grupo (MENGEL et al., 1992). Este método consiste em medir indiretamente a viabilidade celular pela atividade enzimática mitocondrial das células vivas. Quando as células estão vivas as desidrogenases mitocondriais são capazes de agir sobre substratos como o 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium (MTT) levando a redução desta molécula formando assim, o Azul de Formazan. Portanto, quanto maior a viabilidade celular em uma determinada amostra, mais

Azul de Formazan é formado. O azul de formazan é solubilizado com SDS. A leitura da quantidade de azul de formazan formado é medida através do espectrofotômetro (Beckman DU 640) utilizando-se comprimento de onda de 540 nm.

Deste modo, após a incubação de 24 h das células de linhagens tumorais com a BjussuLAAO, foram adicionados aos poços de cultivo celular, 10 µL de MTT na concentração de 5 mg/mL. A placa foi então incubada por mais 3 h em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37° C. Após este período, foram acrescentados 100 µL de solução a 10% de SDS/HCL 0,01N, para dissolver os sais de formazan. As placas de cultivo celular foram mantidas por uma noite a 37° C a temperatura ambiente. A avaliação da formação dos sais de formazan nas amostras, foi medida em espectrofotômetro a 540 nm. A citotoxicidade da BjussuLAAO sobre a linhagem tumoral, foi calculada conforme a seguinte fórmula:

$$(A) \% \text{ de Crescimento} = \frac{[(D.O \text{ Tumor} + \text{substância teste}) - (D.O \text{ Basal MTT/SDS})] \times 100}{[(D.O \text{ Tumor} + \text{meio de cultura}) - D.O \text{ Basal MTT/SDS}]}$$

$\% \text{ citotoxicidade da substância teste} = 100 - \% \text{ de crescimento celular (A)}$

D.O = Densidade óptica

SDS=Dodecil sulfato de sódio

Estes ensaios foram realizados em colaboração com o Prof. Dr. Auro Nomizo (FCFRP-USP).

3.2.12 – Atividade Bactericida

3.2.12.1 – Preparo das Bactérias Gram Negativa e Gram positiva para avaliação da atividade bactericida da BjussuLAAO

Cepas foram incubadas em estufa a 37° C, em meio semi-sólido contendo ágar, fosfato de sódio 0,01M e peptona (1%) em pH 7,4; após 24 h, as cepas das

bactérias *S. aureus* (ATCC25923) e *E. coli* (ATCC29648) encontram-se em fase Log de crescimento e prontas para o inóculo. As bactérias foram transferidas para um tubo contendo 1.000 µL de PBS, onde a concentração de bactérias foi ajustado na escala de 0,5 Mc Farland ($1,5 \times 10^8$ UFCs). Após esta transferência, esta solução de bactérias foi diluída, retirando uma alíquota de 10 µL desta solução e colocando em tubos “eppendorf” contendo 90 µL de PBS, obtendo um volume final de 100 µL.

3.2.12.2 – Efeito citotóxico da BjussuLAAO sobre bactérias

A BjussuLAAO foi incubada nos tubos “eppendorf” contendo 100 µL de solução bacteriana em duas doses, 48 e 24 µg, por 30 e 60 min. Amostras de 5 µL foram recolhidas da solução bacteriana contendo a enzima BjussuLAAO e aplicadas em meios de cultura semi-sólido também contendo ágar, peptona (1%) e fosfato de sódio 0,01 M, em placas de Petri, incubadas em estufa a 37°C para leitura e contagem das colônias após 24h (HEMAN-ACKAH, 1975).

A solução controle de crescimento bacteriano, foi avaliada, colocando PBS ao invés da enzima, verificando assim o aumento de colônias sem a interferência da BjussuLAAO.

3.2.13 - Atividade Leishmanicida

3.2.13.1 – Condições de cultura de espécies de *Leishmania*

As espécies de *Leishmania* utilizadas neste estudo foram *L. amazonensis* (MPRO/BR/72/M1841-LV-79), *L. braziliensis* (MHOM/BR/75/M2904), *L. major* (LV-

39, clone 5-Rho-SU/59/P) e *L. donovani* (clone LV9-3 from MHOM/ET /67/HU3). Formas promastigota das espécies de *Leishmania* cresceram em meio M199 (Gibco) suplementado com Hepes 40 mM (pH 7,4), adenina 0,1 mM, haemina 7,7 mM, 10% (v/v) soro fetal bovino inativado, penicilina 50U/mL e estreptomicina 50 µg/mL. As culturas foram incubadas a 26°C, e células foram retiradas nas densidades entre 3×10^6 e 3×10^7 parasitas/ mL (KAPLER *et al.*, 1990). A viabilidade foi avaliada pela motilidade e a densidade celular foi determinada utilizando um hemocítômetro.

3.2.13.2. – Efeito citotóxico da BjussuLAAO sobre *Leishmania*

O efeito citotóxico direto da BjussuLAAO sobre as espécies de *Leishmania* foi medido da seguinte forma: parasitas (3×10^6 /mL) foram incubados em meio M199 suplementado com 10% de soro fetal bovino na presença ou ausência de BjussuLAAO (0.2-5 µg/mL) por 4h. Formas promastigotas de *L. braziliensis* foram incubadas com BjussuLAAO (10 µg/mL) e catalase (0.5 mg/mL) por 12 h a 25°C em uma microplaca. Animais pertencentes a grupos controle sem BjussuLAAO, com ou sem catalase, e com ou sem peróxido de hidrogênio 6 mM (SIGMA) também foram testados. Formas promastigotas foram incubadas com BjussuLAAO em PBS sem aminoácidos, para supressão de substrato. Os parasitas foram então retirados com 0,5µCi/mL [³H] timidina, e a incorporação de radioatividade pelos parasitas viáveis foram determinados após 16 h em um espectrômetro de cintilação β-counter. A dose efetiva 50% (DE50) foi obtida pela

diluição seriada da enzima BjussuLAAO, e calculada com uma curva dose-resposta utilizando o software GraphPad Prism.

3.2.14 – Atividade Tripanocida

Para o bioensaio contra *Trypanosoma cruzi* (Cepa Y) utilizou-se camundongos suíços pesando 18 – 22 g, infectados com *T. cruzi* pela via intraperitoneal, para utilizarmos a forma tripomastigota. O sangue infectado foi coletado pelo método de punção cardíaca utilizando heparina como anticoagulante em uma proporção de 7:3 (sangue:anticoagulante v/v) no pico da parasitemia, sete dias após a infecção, em uma concentração de 2×10^6 parasitas/mL.

Soluções foram preparadas em placas de microtitulação contendo 10 µL da solução estoque de diluição e 190 µL de sangue infectado.

Soluções estoques da enzima BjussuLAAO foram preparadas pela diluição de 1 mg da enzima em 25 µL de DMSO e 200 µL de salina (NaCl 0,9%). Alíquotas desta solução estoque foram misturadas com a solução de sangue infectado até obter as seguintes concentrações da enzima BjussuLAAO na mistura: 8, 32 e 128 µg/µL.

Foram utilizados como controles sangue infectado não contendo nenhuma droga, apenas solução de diluição da amostra na concentração equivalente das amostras utilizadas no teste e sangue infectado contendo violeta genciana na concentração de 250 µg/mL.

As placas foram mantidas a 4° C por 24 h e o número de parasitas determinado de acordo com a técnica de BRENER (1962). Este método baseia-se

na técnica desenvolvida por PIZZI (1957), onde 50 μ L de sangue fresco retirado do camundongo foi avaliado a fresco, e sobre a gota colocamos uma lamínula (22 x 22 mm). A contagem dos parasitas foi realizada em lente objetiva de 40X e lente ocular de 10X. O número de tripanossomas em 5 μ L de sangue foi determinado pela contagem de parasitas somados em 50 campos da lâmina e então este número multiplicado por 20,214 (fator encontrado para o microscópio NIKON, modelo YS100). Todos os bioensaios foram realizados em triplicata. A porcentagem de lise do *T. cruzi* na forma tripomastigota representa a atividade tripanocida. A dose efetiva 50% (DE50) foi determinada similar a atividade leishmanicida.

Carl W. Scheele – Maior químico-farmacêutico da história

4 – RESULTADOS

4.1 - Purificação da LAAO do veneno de *B. jararacussu*.

4.1.1 – Filtração em Gel de Sephadex G-75

O veneno bruto de *B. jararacussu*, cromatografado através da filtração em gel de Sephadex G-75, foi desdobrado em 4 frações designadas BJI, BJII, BJIII e BJIV (Fig. 3).

Foi avaliada a atividade sobre a L-leucina em cada tubo das frações obtidas na referida filtração. Alíquotas de 10 µL foram retiradas de cada um destes tubos e adicionadas a outros tubos de ensaio contendo 0,5 mL de solução ensaio (item 3.2.5). A reação foi interrompida com adição de 0,5 mL de ácido cítrico 10% (m/v) e determinada a absorbância em espectrofotômetro a 490 nm. Após as leituras verificou-se maior atividade na primeira fração cromatográfica (BJI), coincidindo com os tubos que apresentavam frações de tonalidade amarela.

Figura 3. Filtração em Gel de Sephadex G-75 do veneno bruto de *B. jararacussu*. **Amostra:** Sobrenadante de 1 g de veneno bruto suspenso em 5 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M pH 8,1 e centrifugada a 12.000 x g/10 min. **Eluição:** tampão AMBIC. Temperatura ambiente. Coluna 90 x 4,0 cm, fluxo de 30 mL/h, volume coletado por tubo: 10 mL, monitorado em 280 nm (■-----■). Atividade sobre LAAO monitorada em Abs. 490 nm (●-----●).

4.1.2 – Cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose.

O pico BJI do veneno de *B. jararacussu* (Fig. 3), após cromatografia em Benzamidina-Sepharose, foi desdobrado em 3 subfrações designadas BSI, BSII e BSIII (Fig. 4).

A atividade sobre L-leucina foi detectada na subfração BSII, que também apresentou tonalidade amarela

Figura 4. Cromatografia de afinidade em Benzamidina-Sepharose da fração BJI do veneno bruto de *B. jararacussu*. **Amostra:** 15 mg de BJI em 2,5 mL de água destilada. **Eluição:** 40 mL de água destilada; 45 mL de tampão fosfato de sódio 20 mM pH 7,5 e 60 mL de tampão glicina 20 mM pH 3,2. Temperatura ambiente. Coluna 1,8 x 4,5 cm, volume coletado por tubo: 5 mL, monitorado em 280 nm (■-----■). Atividade sobre LAAO monitorada em Abs. 490 nm (●-----●).

4.1.3– Cromatografia hidrofóbica em Fenil-Sepharose.

A sub-fração BSII do veneno de *B. jararacussu* após cromatografia em Fenil-Sepharose foi desdobrada em 5 subfrações designadas FSI, FSII, FSIII, FSIV e FSV (Fig.5). A atividade sobre L-leucina foi detectada na subfração FSI, que também apresentou tonalidade amarela. A sub-fração FSI é a LAAO do veneno de *B. jararacussu* (BjussuLAAO).

Figura 5. Cromatografia hidrofóbica em Fenil-Sepharose da sub-fração BSII do veneno bruto de *B. jararacussu*. **Amostra:** 10 mg de BSII em 2 mL de água destilada. **Eluição:** 25 mL de sulfato de amônio 2 M (obtenção da sub-fração FSI); 25 mL de sulfato de amônio 1,5 M; 25 mL de sulfato de amônio 1 M (obtenção da sub-fração FSII); 25 mL de sulfato de amônio 0,5 M (obtenção da sub-fração FSIII); 25 mL de Tris base 10 mM pH 8,6 (obtenção da sub-fração FSIV) e 25 mL de água (obtenção da sub-fração FSV). Temperatura ambiente. Coluna 1,8 x 5,5 cm, volume coletado por tubo: 2,5 mL, monitorado em 280 nm (■-----■). Atividade sobre LAAO monitorada em Abs. 490 nm (●-----●).

4.1.4– Eletroforese em Gel de Poliacrilamida com SDS.

A Figura 6 apresenta o perfil protéico da enzima BjussuLAAO, comparada ao Padrão de massa molecular, confirmando a pureza da proteína e a confiabilidade do processo de purificação.

Figura 6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida: 1 – sub-fração FSI (enzima BjussuLAAO), 2 – Padrão de Peso Molecular (PPM). Condições: 200 V (voltagem), 10 mA (amperagem) em 3h 40min. (tempo). Corada com Azul Coomassie G-250 0,2% em H₂O/MeOH 1:1 (v/v) durante 15 min. O descoramento foi obtido com trocas sucessivas de solução de ácido acético glacial à 10% (v/v). Padrão de PM = fosforilase b (96.000), soro albumina bovina (67.000), ovoalbumina (43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactalbumina (14.400).

A Figura 7 apresenta a curva padrão de massa molecular que relaciona a distância de migração (cm) com a massa relativa (Mr) de padrões de proteínas. A massa molecular da BjussuLAAO foi determinada em 61000 Da.

Figura 7. Curva padrão de determinação da massa molecular. Padrão de PM = fosforilase b (94.000), soro albumina bovina (67.000), ovoalbumina (43.000), anidrase carbônica (30.000), inibidor de tripsina (20.100) e α -lactalbumina (14.400).

4.1.5– Determinação do Ponto Isoelétrico (pI).

A enzima BjussuLAAO é uma proteína ácida com pI de aproximadamente 5,8 (Fig. 8).

Figura 8. Curva padrão para determinação do pI da enzima BjussuLAAO através do sistema eletroforese Bi-dimensional em gel de poliacrilamida a 12 %. Escala de pHs 3 – 10.

4.1.6 – Estudos Estruturais e Modelagem Molecular da BjussuLAAO.

Os primeiros 23 resíduos de aminoácidos da região N-terminal, da enzima BjussuLAAO (ADDRN PLEEC FRETD YEEFL EIA) foram identificados pela análise automática de degradação de Edman. O cDNA da BjussuLAAO foi identificado pela triagem (por seqüenciamento) de clones da biblioteca genômica de *B. jararacussu* e comparado com outros cDNAs de LAAOs de algumas serpentes (Fig. 9). As possíveis trincas de bases codificadoras de aminoácidos

(“codon usage”) de LAAOs de serpentes foi elaborada a partir da comparação das seqüências de nucleotídeos de *C. rhodostoma*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (Tabela 2). A matriz de identidade nucleotídica demonstrou similaridade de 99% entre as *Bothrops* e 93-95% com o gênero *Calloselasma*. O cDNA da BjussuLAAO codificou, para uma proteína madura de aproximadamente 473 resíduos de aminoácidos (Fig. 10 A). O alinhamento múltiplo das estruturas primárias das LAAOs demonstrou 98% de similaridade no gênero *Bothrops* e 86% com o gênero *Calloselasma* (Fig. 10 B; Tabela 3). Análise filogenética, tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos, das LAAOs de serpentes, claramente demonstra dois ramos evolutivos distintos: 1-agrupa as LAAOs dos gêneros *Bothrops*, *Calloselasma*, *Trimeresurus* e *Agkistrodon*, e 2-contendo somente as enzimas do gênero *Crotalus* (Fig. 11). Estes estudos estruturais e evolutivos ainda merecem maior atenção, pois são poucas as estruturas primárias depositadas e/ou publicadas sobre estas enzimas, e menos ainda as estruturas cristalográficas (DU & CLEMETSON, 2002; FRANÇA *et al.*, 2006; STABELI *et al.*, 2006).

Como o alinhamento múltiplo demonstrou alta similaridade estrutural da BjussuLAAO com a LAAO de *Calloselasma*, a única enzima que possui a estrutura cristalográfica depositada até o momento, permitindo assim a modelagem molecular desta enzima, baseando-se na estrutura da *Calloselasma* (Fig. 10 A e B).

Os desvios R.m.s., do átomo de C_α, obtidos pela sobreposição entre os modelos das LAAOs de *B. moojeni* e *B. jararacussu* com o monômero da estrutura cristalina de *Calloselasma rhodostoma* foram de 0,741 e 0,835 Å.

Os parâmetros comparativos mostraram 64 mutações para a BmooLAAO e 46 para a BjussuLAAO, as quais não induziram nenhuma mudança estrutural significativa nos modelos calculados. Os desvios R.m.s. obtidos pela sobreposição específica de três regiões principais (1-domínio ligante de FAD, 2-domínio ligante de substrato e 3-domínios helicoidais) dos modelos das LAAOs de *B. moojeni* e *B. jararacussu* confirmaram o alto grau de similaridade estrutural entre estas enzimas com a estrutura cristalográfica da LAAO de *C. rhodostoma* (Tabelas 3, 4 e 5).

No caso do modelo molecular da BjussuLAAO (Fig. 10), a região que apresentou o maior número de mutações (17,5%) quando comparada com a LAAO de *C. rhodostoma*, foi o domínio ligante de FAD (resíduos de 35-64, 242-318, e 446-471). Em contraste, outras duas regiões funcionais, o domínio ligante de substrato (resíduos 5-25, 73-129, 233-236, e 323-420) e os domínios de alfa-hélice (resíduos 130-230) apresentam somente 12,8 e 9,9% de resíduos diferentes, respectivamente.

#AJ271725Ca	GCA GAT GAC AGA AAC CCT CTA GCG GAA TGC TTC CAA GAA AAT GAC TAT GAA GAA TTT CTA	[60]
#Bjararacussu	 C..C T.. .A.G.C.G.	
#Bmoojeni	C .. .A.G.C.G.	
#ABO72392Ag	C .. .A.G.C.	
#AY338966Tr	C .. .A.G.C.	
#AY277739Tr	C .. .A.G.C.	
#AF093248Cr	... C..C .. .A.G.C.G	
#AF071564Cr	... C..C .. .A.G.C.G	
#AJ271725Ca	GAG ATC GCC AGA AAT GGT CTG AAA GCG ACA TCA AAC CCA AAA CAT GTT GTG ATT GTA GGT	[120]
#Bjararacussu	A.GC A..G.G.	
#Bmoojeni	A.GC A..G.G.	
#ABO72392Ag		
#AY338966Tr	T	
#AY277739Tr		
#AF093248Cr	T .. .A.C.G.	
#AF071564Cr	T .. .A.C.G.	
#AJ271725Ca	GCA GGA ATG GCT GGG CTT AGT GCA GCC TAT GTT CTT GCA GGG GCT GGA CAT CAG GTG ACA	[180]
#Bjararacussu	 T..	
#Bmoojeni	 T..	
#ABO72392Ag	 T..	
#AY338966Tr	 T..	
#AY277739Tr	 T..	
#AF093248Cr		
#AF071564Cr		
#AJ271725Ca	GTT CTT GAA GCC AGT GAA CGT CCG GGA GGA CGA GTG AGA ACT TAT CGA AAT GAG GAA GCA	[240]
#Bjararacussu	 G.AA.AGA.. .A.	
#Bmoojeni	 G.AAGA.. .A.	
#ABO72392Ag	 G..GC A.. .A.	
#AY338966Tr	 G..GCA.	
#AY277739Tr	 G..GCA.	
#AF093248Cr	 GTAGA A.A ..C TGG	
#AF071564Cr	 GTAGA A.A ..C TGG	
#AJ271725Ca	GGC TGG TAT GCC AAT CTC GGG CCC ATG CGT TTA CCT GAG AAA CAC AGG ATT GTC CGG GAA	[300]
#Bjararacussu		
#Bmoojeni		
#ABO72392Ag		
#AY338966Tr		
#AY277739Tr		
#AF093248Cr	TAT GCC A.. CTT GGG .C. AT. .GT T.A .C. ACG AAA C.C .GG ATT GTC CGG .AA TAT ATC	
#AF071564Cr	TAT GCC A.. CTT GGG .C. AT. .GT T.A .C. ACG AAA C.C .GG ATT GTC CGG .AA TAT ATC	
#AJ271725Ca	TAT ATC AGA AAG TTT GAT CTC CGG TTG AAT GAA TTT TCT CAG GAA AAT GAC AAT GCC TGG	[360]
#Bjararacussu	G. ..G .A.G.A ...	
#Bmoojeni	G. ..G .A.G.A ...	
#ABO72392Ag	G. ..G .A.C	
#AY338966Tr	A. ..G .A.	
#AY277739Tr	A. ..G .A.	
#AF093248Cr	A.A .AG TTT G.T C.G A.G T.G AAT GAA TT. TCT CAG GAA A.T ..GCA TGG TAT .TT	
#AF071564Cr	A.A .AG TTT G.T C.G A.G T.G AAT GAA TT. TCT CAG GAA A.T ..GCA TGG TAT .TT	
#AJ271725Ca	TAT TTT ATC AAA AAC ATC AGG AAG AAA GTT GGG GAA GTC AAG AAA GAC CCT GGC CTC TTG	[420]
#Bjararacussu	G. ..ATG.T ...	
#Bmoojeni	G. ..ATG.T ...	
#ABO72392Ag	G. ..AG. ...	
#AY338966Tr	C.. ..G.C. ..AG. ...	
#AY277739Tr	C.. ..G.C. ..AG. ...	
#AF093248Cr	ATC AAA .A. .TC .GG .AG ..A GTA CGG .AA .TC A.G AA. ..C CCT .G. .TC TTG GAA .AT	
#AF071564Cr	ATC AAA .A. .TC .GG .AG ..A GTA CGG .AA .TC A.G AA. ..C CCT .G. .TC TTG GAA .AT	

#AJ271725Ca	GAG	ACG	CCA	TCT	GTG	ACA	GCT	GAT	TAT	GTC	ATT	GTG	TGC	ACT	ACG	TCA	AGG	GCC	GTC	CGT	[900]
#Bjararacussu	...	...	TT.	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	.C.	...	
#Bmoojeni	...	...	TT.	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	.C.	...	
#ABO72392Ag	...	.T.	G..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	AC.	...	
#AY338966Tr	..C	...	T.G	.T.	...	...	..C	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	G..	...	.C.	...	
#AY277739Tr	..C	...	T.G	.T.	...	...	..C	...	...	...	...	..A	...	...	...	...	...	...	.C.	...	
#AF093248Cr	...	.T.	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.C.	...	
#AF071564Cr	...	.T.	T..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.C.	...	
#AJ271725Ca	CTC	ATC	AAA	TTT	AAT	CCA	CCC	CTT	TTG	CCA	AAG	AAA	GCG	CAT	GCT	TTG	CGG	TCT	GTC	CAC	[960]
#Bjararacussu	.G.	...	..G	...	G.A	...	...	...	CC.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#Bmoojeni	.G.	...	..G	...	G.A	...	...	...	CC.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#ABO72392Ag	.G.	...	..G	...	G.A	...	...	...	CC.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AY338966Tr	.G.	...	..G	...	G.A	...	...	...	CC.	.T.	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	
#AY277739Tr	.G.	...	..G	...	G.A	...	...	...	CC.	.T.	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	
#AF093248Cr	.G.	...	..G	...	G.A	...	...	...	CC.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	
#AF071564Cr	.G.	...	..G	...	G.A	...	...	...	CCT	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AJ271725Ca	TAT	AGA	AGT	GGC	ACC	AAG	ATC	TTC	CTC	ACT	TGC	ACT	ACG	AAA	TTT	TGG	GAG	GAT	GAT	GGC	[1020]
#Bjararacussu	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	
#Bmoojeni	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	
#ABO72392Ag	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	..A	...	
#AY338966Tr	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	..A	...	
#AY277739Tr	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	C..	...	...	..A	...	
#AF093248Cr	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..AA	.A.	...	...	...	...	...	...	...	
#AF071564Cr	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	...	...	...	...	...	...	...	
#AJ271725Ca	ATT	CAT	GGT	GGG	AAG	TCC	ACA	ACT	GAT	CTT	CCA	TCC	CGA	TTC	ATC	TAC	TAC	CCT	AAC	CAT	[1080]
#Bjararacussu	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#Bmoojeni	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#ABO72392Ag	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AY338966Tr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AY277739Tr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AF093248Cr	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AF071564Cr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AJ271725Ca	AAC	TTT	ACT	AAT	GGA	GTT	GGG	GTT	ATT	ATA	GCC	TAT	GGC	ATT	GGT	GAT	GAT	GCC	AAT	TTC	[1140]
#Bjararacussu	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
#Bmoojeni	...	...	C..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	.A.	
#ABO72392Ag	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AY338966Tr	...	...	...	.G.	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AY277739Tr	...	...	...	.G.	..C	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AF093248Cr	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AF071564Cr	...	...	...	.G.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AJ271725Ca	TTT	CAA	GCT	CTT	GAT	TTC	AAG	GAC	TGT	GCT	GAT	ATT	GTC	TTT	AAT	GAC	CTT	TCA	TTG	ATC	[1200]
#Bjararacussu	...	G..	...	...	...	...	G..	...	...	.G.	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	
#Bmoojeni	...	...	...	...	...	...	G..	...	...	.G.	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	
#ABO72392Ag	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	
#AY338966Tr	...	...	...	...	...	..G	...	...	...	.G.	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	
#AY277739Tr	...	...	...	...	..G	...	...	...	...	.G.	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	
#AF093248Cr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	
#AF071564Cr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	...	...	
#AJ271725Ca	CAT	CAG	CTG	CCG	AAG	AAA	GAT	ATC	CAG	TCC	TTC	TGT	TAT	CCC	TCA	GTG	ATT	CAA	AAA	TGG	[1260]
#Bjararacussu	...	...	...	..C	...	G..	..G	...	...	G..	A..	...	CG.	...	...	A..	...	...	..G	...	
#Bmoojeni	...	...	...	..C	...	G..	..G	...	...	G..	A..	...	CG.	...	...	A..	...	...	..G	...	
#ABO72392Ag	...	...	...	..C	.G.	G..	..G	...	...	A..	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	
#AY338966Tr	...	...	...	..C	.G.	G..	..G	...	...	A..	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	
#AY277739Tr	...	...	...	..C	.G.	G..	..G	...	...	A..	...	...	...	...	...	A..	...	...	...	...	
#AF093248Cr	...	...	...	..C	...	G..	...	...	...	A.T	..T	...	CG.	...	...	A..	...	...	..G	...	
#AF071564Cr	...	G..	...	..C	...	G..	...	..T	...	A.T	...	...	C..	...	...	A..	...	...	..G	...	

#AJ271725Ca	AGC	CTG	GAT	AAG	TAT	GCT	ATG	GGT	GGT	ATA	ACC	ACC	TTC	ACT	CCC	TAC	CAG	TTT	CAA	CAT	[1320]
#Bjararacus	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#Bmoojeni	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AB072392Ag	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	..T	...	...	...	...	...	...	...	
#AY338966Tr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AY277739Tr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AF093248Cr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AF071564Cr	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AJ271725Ca	TTT	AGT	GAC	CCA	CTC	ACT	GCA	TCT	CAA	GGC	AGA	ATC	TAC	TTT	GCA	GGG	GAG	TAT	ACG	GCC	[1380]
#Bjararacus	...	...	..A	G.G	...	...	...	C..	GT.	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	
#Bmoojeni	...	...	..A	G.G	...	...	...	C..	GT.	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	
#AB072392Ag	...	...	..A	..G	...	...	...	...	GT.	.A.	...	...	...	...	...	...	...	C..	...	...	
#AY338966Tr	...	...	..A	G.G	...	...	T..	CA.	GT.	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AY277739Tr	...	...	..A	G.G	...	...	T..	CA.	GT.	.A.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	
#AF093248Cr	...	...	..A	G.G	...	...	...	C..	TTT	AAG	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	
#AF071564Cr	...	...	..A	G.G	..T	...	...	C..	TTT	AAG	...	...	...	...	...	...	...	...	..A	...	
#AJ271725Ca	CAA	GCT	CAT	GGT	TGG	ATT	GAC	AGC	ACA	ATT	AAG	T									[1414]
#Bjararacus	...	...	...	...	...	...	.C.	...	...	...	...	...									
#Bmoojeni	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...									
#AB072392Ag	G..	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...									
#AY338966Tr	..T	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...									
#AY277739Tr	..T	...	...	...	...	...	...	...	T..	...	...	...									
#AF093248Cr	...	TT.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...									
#AF071564Cr	...	TT.	...	...	...	...	...	...	...	...	...	...									

Figura 9. MEGA alinhamento múltiplo das seqüências de cDNAs de L-aminoácido oxidases obtidas de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* com outras seqüências nucleotídicas de LAAOs de serpentes. LAAOS de serpentes: AY338966 – *Trimeresurus stejnegeri*; AY277739 – *Trimeresurus stejnegeri*; AF093248 – *Crotalus atrox*; AF071564 – *Crotalus adamanteus*; AB072392 – *Agkistrodon blomhoffi*.

Tabela 2. Comparação das seqüências codificadoras de aminoácidos para as LAAOs de serpentes (“Codon Usage”).

<i>Calosellasma rhodostoma</i>					<i>Bothrops jararacussu</i>		
AA	Nucl	number	/1000	fraction	number	/1000	fraction
Gly	GGG	7	14.86	0.21	6	12.74	0.18
Gly	GGA	11	23.35	0.33	10	21.23	0.3
Gly	GGT	7	14.86	0.21	10	21.23	0.3
Gly	GGC	8	16.99	0.24	7	14.86	0.21
Glu	GAG	9	19.11	0.31	13	27.6	0.33
Glu	GAA	20	42.46	0.69	26	55.2	0.67
Asp	GAT	21	44.59	0.64	17	36.09	0.65
Asp	GAC	12	25.48	0.36	9	19.11	0.35
Val	GTG	10	21.23	0.33	8	16.99	0.27
Val	GTA	5	10.62	0.17	8	16.99	0.27
Val	GTT	8	16.99	0.27	7	14.86	0.23
Val	GTC	7	14.86	0.23	7	14.86	0.23
Ala	GCG	3	6.37	0.09	2	4.25	0.06
Ala	GCA	8	16.99	0.24	8	16.99	0.24
Ala	GCT	11	23.35	0.33	10	21.23	0.3
Ala	GCC	11	23.35	0.33	13	27.6	0.39
Arg	AGG	4	8.49	0.19	4	8.49	0.17
Arg	AGA	7	14.86	0.33	7	14.86	0.29
Ser	AGT	6	12.74	0.22	6	12.74	0.21
Ser	AGC	4	8.49	0.15	5	10.62	0.18
Lys	AAG	17	36.09	0.47	19	40.34	0.59
Lys	AAA	19	40.34	0.53	13	27.6	0.41
Asn	AAT	15	31.85	0.71	15	31.85	0.71
Asn	AAC	6	12.74	0.29	6	12.74	0.29
Met	ATG	6	12.74	1	8	16.99	1
Ile	ATA	4	8.49	0.13	3	6.37	0.1
Ile	ATT	15	31.85	0.48	15	31.85	0.48
Ile	ATC	12	25.48	0.39	13	27.6	0.42
Thr	ACG	5	10.62	0.19	4	8.49	0.15
Thr	ACA	7	14.86	0.27	9	19.11	0.33
Thr	ACT	9	19.11	0.35	9	19.11	0.33
Thr	ACC	5	10.62	0.19	5	10.62	0.19
Trp	TGG	5	10.62	1	5	10.62	1

Tabela 3. Matriz de Identidade das seqüências nucleotídicas de LAAOs de serpentes.

LAAOs	Bmooj	Bjussu	Crhod
Bmooj	1,000	0,995	0,932
Bjussu	---	1,000	0,927
Crhod	---	---	1,000

A

B

Figura 10. A: Modelagem Molecular da enzima BjussuLAAO.

B: Modelagem demonstrando nos pontos vermelhos onde ocorrem as mutações entre a BjussuLAAO e a LAAO isolada do veneno de *C. rodhostoma*. Modelagem molecular pelos programas “O” e “RIBBONS”.

Figura 11. Fenogramas da análise fenética de LAAOs de serpentes. **(A)** *Bothrops moojeni* (BmooLAAO-I) com outras LAAOs de serpentes. **(B)** *Bothrops jararacussu* (BjussuLAAO) com outras LAAOs de serpentes. LAAOS: AJ271725 – *Calloselasma rhodostoma*; AY338966 – *Trimeresurus stejnegeri*; AY277739 – *Trimeresurus stejnegeri*; AF093248 – *Crotalus atrox*; AF071564 – *Crotalus adamanteus*; ABO72392 – *Agkistrodon blomhoffi*.

Tabela 4. Desvios R.m.s. obtidos da sobreposição entre três regiões principais da BmooLAAO-I com a estrutura da LAAO de *C. rhodostoma*. Dados calculados utilizando o programa “O”.

	Resíduos	R.m.s.d. (Å)
Domínio ligante de FAD	35 - 64	0,374
	242 - 318	0,569
	446 - 471	0,606
Domínio ligante de Substrato	5 - 25	0,432
	73 - 129	0,648
	233 - 236	0,190
	323 - 420	0,668
Domínio Helicoidal	130 - 230	0,656

Tabela 5. Desvios R.m.s. obtidos da sobreposição entre três regiões principais da BjussuLAAO-I com a estrutura da LAAO de *C. rhodostoma*. Dados calculados utilizando o programa “O”.

	Resíduos	R.m.s.d. (Å)
Domínio ligante de FAD	242 - 318	0,656
	446 - 471	0,718
Domínio ligante de Substrato	233 - 236	0,375
	323 - 429	0,789
Domínio Helicoidal	155 - 230	0,855

4.2 – Avaliação Funcional da BjussuLAAO

4.2.1 - Indução de edema

A Figura 12 mostra a porcentagem de edema verificada após a aplicação por via i.d., da toxina BjussuLAAO.

Os animais tratados com 100 µg da toxina apresentaram expressivo edema quando comparado ao grupo controle de PBS e aos outros grupos tratados com doses inferiores da toxina.

Figura 12. Indução de edema em pata de camundongos pela toxina BjussuLAAO. **Tratamentos:** **G1** = 5 µg BjussuLAAO/animal; **G2** = 10 µg BjussuLAAO/animal; **G3** = 25 µg BjussuLAAO/animal; **G4** = 50 µg BjussuLAAO/animal; **G5** = 100 µg BjussuLAAO/animal; **PBS** = 50 µL. N = 5. Os resultados representam a média ± DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

4.2.2 – Atividade miotóxica “in vivo”

A Figura 13 mostra a miotoxicidade induzida pela toxina BjussuLAAO 3 horas após a injeção via i.m.

Os grupos tratados com BjussuLAAO não apresentaram aumento significativo da enzima CK. A toxina não apresentou atividade miotóxica quando comparada ao grupo controle da toxina BthTX-I.

Figura 13. Indução da miotoxicidade em camundongos pela toxina BjussuLAAO. **Tratamentos:** **G1** = 25 µg BjussuLAAO/animal; **G2** = 50 µg BjussuLAAO/animal; **G3** = 100 µg BjussuLAAO/animal; **BthTX-I** = 50 µg BthTX-I/animal; **PBS** = 50 µL. N = 5. Os resultados representam a média ± DP.

4.2.3 - Atividade hemorrágica

A Figura 14 mostra que a toxina BjussuLAAO, aplicada via i.d. na região dorsal dos animais, não induz hemorragia nas doses estudadas, quando comparada ao grupo controle do veneno bruto de *B. jararacussu* (VB).

A Figura 15 apresenta duas peles recortadas da região dorsal de camundongos 2 horas após a aplicação do VB (Fig. 16A) e de 200 $\mu\text{g}/\text{animal}$ da toxina BjussuLAAO (Fig. 16B).

Figura 14. Indução de hemorragia em camundongos pela toxina BjussuLAAO. **Tratamentos:** **G1** = 50 μg BjussuLAAO/animal; **G2** = 100 μg BjussuLAAO/animal; **G3** = 200 μg BjussuLAAO/animal; **VB** = 20 μg VB/animal; **PBS** = 50 μL . N = 5. Os resultados representam a média $\pm$ DP.

Figura 15. Peles de camundongos após indução da hemorragia pelo VB (20 µg/animal) e pela toxina BjussuLAAO (200 µg/animal).

4.2.4 - Atividade coagulante

A Figura 16 mostra a coagulação induzida pela toxina BjussuLAAO, após a aplicação em plasma humano.

Todas as concentrações ensaiadas apresentaram efeito coagulante, cuja concentração de 0,5 µg/uL apresentou menor tempo de coagulação. Como controle do experimento utilizamos 25 µL de solução de CaCl₂ (25 mM), onde o plasma coagulou em 4 min.

Figura 16. Indução da coagulação em plasma humano pela toxina BjussuLAAO. **Tratamentos:** **G1** = 0,02 µg/uL BjussuLAAO; **G2** = 0,06 µg/uL BjussuLAAO; **G3** = 0,125 µg/uL BjussuLAAO; **G4** = 0,18 µg/uL BjussuLAAO; **G5** = 0,25 µg/uL BjussuLAAO; **G6** = 0,5 µg/uL BjussuLAAO. N = 5. Os resultados representam a média ± DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

4.2.5 – Atividade Fibrinogenolítica

As Figuras 17 A e B mostram a degradação do fibrinogênio induzida pela toxina BjussuLAAO, em diferentes concentrações e tempo de incubação.

Todas as concentrações e tempos ensaiados com a BjussuLAAO apresentaram efeito fibrinogenolítico.

A Figura 18 apresenta a ação da BjussuLAAO incubada com inibidores de metaloproteases e serino proteases sobre o fibrinogênio, demonstrando que não houve inibição da atividade, assim a ação fibrinogenolítica, de fato é da enzima BjussuLAAO.

Figura 17. Atividade Fibrinogenolítica da toxina BjussuLAAO.

A – Diferentes concentrações

Tratamentos: **1** = Fibrinogênio controle; **2** = 1 µg BjussuLAAO + Fibrinogênio; **3** = 2 µg BjussuLAAO + Fibrinogênio; **4** = 4 µg BjussuLAAO + Fibrinogênio; **5** = 8 µg BjussuLAAO + Fibrinogênio; **6** = 16 µg BjussuLAAO + Fibrinogênio; **7** = 32 µg BjussuLAAO + Fibrinogênio.

B - Diferentes tempos de incubação.

Tratamentos: **1** = Fibrinogênio controle; **2** = BjussuLAAO (4 µg) + Fibrinogênio 15 min; **3** = BjussuLAAO (4 µg) + Fibrinogênio 30 min; **4** = BjussuLAAO (4 µg) + Fibrinogênio 1 h; **5** = BjussuLAAO (4 µg) + Fibrinogênio 2 h; **6** = BjussuLAAO (4 µg) + Fibrinogênio 4 h; **7** = BjussuLAAO (4 µg) + Fibrinogênio 8 h; **8** = BjussuLAAO (4 µg) + Fibrinogênio 24 h.

Figura 18. Gel de eletroferese do efeito de inibidores na atividade fibrinogenolítica da BjussuLAAO. Eletroferese em condições redutoras em gel de poliacrilamida. Para o ensaio, 10 μL do fibrinogênio (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$) foram incubados com a enzima BjussuLAAO (4 μg) por 15 minutos à 37°C, na presença de diferentes inibidores, na concentração de 20 mM.

- 1 – Controle: Fibrinogênio (2 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$)
- 2 – BjussuLAAO + β -mercaptoetanol + fibrinogênio
- 3 – BjussuLAAO + EDTA + fibrinogênio
- 4 – BjussuLAAO + 1,10-fenantrolina + fibrinogênio
- 5 – BjussuLAAO + EGTA + fibrinogênio
- 6 – BjussuLAAO + PMSF + fibrinogênio
- 7 – BjussuLAAO + leupeptina + fibrinogênio
- 8 – Controle: BjussuLAAO + fibrinogênio

4.2.6 - Atividade Antitumoral

A Figura 19 mostra a citotoxicidade (ação antitumoral) da toxina BjussuLAAO, após a aplicação sobre células normais e células malignas SKBR3 .

Foram utilizadas concentrações de 0,5 e 0,05 mg da toxina BjussuLAAO, onde na dose de 0,05 mg a citotoxicidade sobre células saudáveis foi baixa mas apresentou alta citotoxicidade em células malignas.

Figura 19. Atividade anti-tumoral da toxina BjussuLAAO sobre SKBR3.

Tratamentos: Utilizaram 2,5 e 0,25 mg de metotrexato como droga controle e 0,5 e 0,05 mg da toxina BjussuLAAO avaliando sua atividade anti-tumoral e ação sobre células saudáveis. N = 4. Os resultados representam a média $\pm$ DP. Letras iguais, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

4.2.7 – Atividade Bactericida

A Figura 20 mostra a ação bactericida da toxina BjussuLAAO, após a aplicação em meios contendo *E. coli* e *S. aureus*.

Os ensaios no tempo de incubação de 60 min apresentaram efeito bactericida bastante significativo ($p < 0,05$).

Figura 20. Atividade bactericida da toxina BjussuLAAO sobre *E. coli* e *S. aureus*. **Tratamentos:** Utilizaram 24 e 48 µg da toxina BjussuLAAO avaliando sua atividade bactericida após 30 e 60 min de incubação e contagem de UFCs após 24 horas. N = 4. Os resultados representam a média ± DP. Letras iguais no mesmo intervalo de tempo, são grupos estatisticamente iguais ($p < 0,05$).

4.2.8 – Atividade Leishmanicida

A Figura 21 mostra a ação leishmanicida da toxina BjussuLAAO, após a aplicação em meios contendo *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. major*.

Foram utilizadas concentrações de 5, 1 e 0,2 $\mu\text{g/mL}$ da toxina BjussuLAAO, onde na concentração de 5 $\mu\text{g/mL}$ a porcentagem de sobrevivência dos parasitas foi abaixo de 10%. A DE50 para *L. amazonensis*, *L. donovani* e *L. major* foi de 0,8, 0,84 e 0,78 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente, não calculamos a DE50 para *L. braziliensis* pelo fato da menor dose utilizada (0,2 $\mu\text{g/mL}$) apresentar citotoxicidade acima de 50%.

Figura 21. Atividade leishmanicida induzida pela toxina BjussuLAAO.

Tratamentos: A atividade foi avaliada em três concentrações diferentes da toxina BjussuLAAO (5, 1 e 0,2 $\mu\text{g/mL}$). N = 3. Os resultados representam a média $\pm$ DP. Letras diferentes no mesmo grupo de tratamento são grupos estatisticamente diferentes ($p < 0,05$).

4.2.9 – Atividade Tripanocida

A Figura 22 mostra a ação tripanomicida da toxina BjussuLAAO, após a aplicação em soluções contendo *T. cruzi*.

Foram utilizadas concentrações de 8, 32 e 128 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ da toxina BjussuLAAO, apresentando na concentração de 128 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$ praticamente 80% de lise do *T. cruzi*, na forma tripomastigota da cepa Y.

Figura 22. Atividade tripanocida induzida pela toxina BjussuLAAO.

Tratamentos: A atividade foi avaliada em três concentrações diferentes da enzima BjussuLAAO (8, 32 e 128 $\mu\text{g}/\mu\text{L}$). Os controles de sangue infectado sem o uso de drogas, contendo apenas DMSO não apresentaram redução dos parasitas, e o sangue infectado tratado com violeta genciana apresentou 100% de atividade tripanocida. N = 3. Os resultados representam a média $\pm$ DP ($p < 0,05$).

Friedrich Wilhelm Adam Sertürner realizando testes com morfina e reconhecendo os efeitos narcóticos deste alcalóide, foi o primeiro a reconhecer esta classe de substâncias.

5 – DISCUSSÃO

Experimentos envolvendo venenos de serpentes não são simples e práticos como aparentam ser. Para se trabalhar com venenos, o pesquisador deve ter ampla base teórica para discutir todos os efeitos visualizados quando administram tais substâncias. Farmacologia, Toxicologia e Bioquímica são consideradas as disciplinas chaves para a compreensão dos envenenamentos animais. Atualmente, com a Biologia Molecular e a Cristalografia, estes conhecimentos devem ser ampliados e, a cada ano, os novos pesquisadores que estão surgindo tendem a englobar mais matérias e conhecimento nas pesquisas envolvendo venenos animais e toxinas.

No presente estudo sobre L-aminoácido oxidase do veneno de *B. jararacussu* revelou vários efeitos que até hoje poucos pesquisadores de toxinas tentaram relacionar, por exemplo, ação antiparasitária e bactericida. Dificilmente um único pesquisador conseguirá fazer todos os testes e explicar todos os resultados obtidos em projetos multidisciplinares. Isso torna cada vez mais importante a ação de pesquisas conjuntas e projetos temáticos com outras Universidades, Faculdades, Departamentos e Laboratórios.

A primeira etapa deste projeto foi o isolamento de uma L-aminoácido oxidase do veneno de *Bothrops jararacussu* denominada BjussuLAAO. A purificação não é simples e a reprodutibilidade apresenta certas dificuldades impostas pela própria enzima BjussuLAAO, como o fato dela se degradar facilmente, não poder liofilizar e congelar a enzima. A purificação requerem três passos cromatográficos, sendo o primeiro passo de exclusão molecular, utilizando coluna contendo Sephadex G-75 (90 x 4,0 cm), que forneceu 4 frações, separando as proteínas de alto e baixo peso molecular. Em seguida aplicamos a primeira

fração (BJI) em uma coluna de afinidade contendo Benzamidina-Sepharose (1,8 x 4,5 cm) onde isolamos o fator coagulante da amostra, depois o terceiro e último passo cromatográfico em Fenil-Sepharose (1,8 x 5,5 cm) forneceu 5 frações, sendo a fração FSI a enzima BjussuLAAO pura. Após cada passo, a fração contendo a BjussuLAAO era concentrada em membranas de ultrafiltração e dialisada. A grande vantagem desta metodologia é a não utilização de aparelhagens caras como a Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC) que precisaria de cuidado redobrado para não degradar a enzima, o custo da purificação e o tempo seriam bem maiores.

Outras duas metodologias descritas na literatura (SAKURAI *et al.*, 2001 e TAKATSUKA *et al.*, 2001) descrevem a purificação de LAAOs das serpentes *Naja naja kaouthia* e *Agkistrodon halys blomhoffii*, respectivamente. Nas duas metodologias também não foi utilizado HPLC, mas apresentam mais passos cromatográficos que sempre geram gastos e perdas na purificação de proteínas. Takatsuka *et al.* (2001) descreveram cinco passos cromatográficos para obter a enzima LAAO que nomearam M-LAO, utilizando uma troca iônica (DEAE-Sepharose), afinidade (Heparina-Sepharose), exclusão molecular (Sephacryl S-300), hidrofóbica (Fenil-Sepharose) e outra troca iônica (Hidroxiapatita). Sakurai *et al.* (2001) descreveram quatro passos cromatográficos para a obtenção da LAAO que nomearam K-LAO, a exclusão molecular (Sephadex G-200), a troca iônica (Bio-Rex 70), a afinidade (Heparina-Sepharose) e a hidrofóbica (Fenil-Sepharose). Pode-se perceber, na comparação das duas metodologias descritas acima com a metodologia adotada neste projeto para obtenção da Bjussu-LAAO, que já existe um caminho que podemos seguir para obter LAAOs de várias serpentes, onde os

passos de exclusão molecular, afinidade e hidrofobicidade aparecem nas três metodologias. Provavelmente algumas LAAOs serão mais fáceis de purificar do que outras, ou seja, dependendo da espécie da serpente da qual o veneno foi extraído, alguns passos cromatográficos poderão ser removidos ou então novos passos deverão ser adicionados.

Os dados obtidos na caracterização bioquímica apresentam a enzima BjussuLAAO com os resultados muito próximos às LAAOs isoladas e descritas até o momento na literatura. A massa molecular da LAAO isolada de *C. rhodostoma* é de 59 kDa (GEYER et al., 2001), a LAAO obtida de *B. alternatus* apresentou Mr de ~ 60.000 e a Mr da BjussuLAAO é de ~ 61.000, o que demonstra proximidade entre os pesos moleculares descritos.

O cDNA foi obtido a partir de “primers” produzidos com a seqüência dos 23 aminoácidos da região N-terminal (ADDRN PLEEC FRET D YEEFL EIA). O cDNA da BjussuLAAO foi identificado pela triagem (por seqüenciamento) de clones da biblioteca genômica de *B. jararacussu* e comparado com outros cDNAs de LAAOs de serpentes (*Trimeresurus stejnegeri*; *Crotalus atrox*; *Crotalus adamanteus*; *Calloselasma rhodostoma* e *Agkistrodon blomhoffi*), inclusive a de *B. moojeni* e apresentaram cerca de ~1414 pares de bases (Fig. 9). As possíveis trincas de bases codificadoras de aminoácidos (“codon usage”) de LAAOs de serpentes foram elaboradas a partir da comparação das seqüências de nucleotídeos de *C. rhodostoma*, *B. jararacussu* e *B. moojeni* (Tabela 2). A matriz de identidade nucleotídica demonstrou similaridade de 99% entre as *Bothrops*, 93-95% com o gênero *Calloselasma* (Tabela 3).

Com a sequência completa realizou-se a comparação com a LAAO isolada e cristalizada da serpente *Calosellasma rhodostoma*, obtendo-se assim a modelagem molecular da BjussuLAAO, onde podemos comparar as diferenças estruturais entre as LAAOs isoladas pelo grupo de pesquisa da FCFRP-USP com outras LAAOs isoladas por outros grupos de pesquisa.

A análise fenética, tanto de nucleotídeos quanto de aminoácidos, das LAAOs de serpentes, claramente demonstra dois ramos evolutivos distintos: 1-agrupa as LAAOs dos gêneros *Bothrops*, *Calloselasma*, *Trimeresurus* e *Agkistrodon*, e 2-contendo somente as enzimas do gênero *Crotalus* (Fig. 11). Estes estudos estruturais e evolutivos ainda merecem maior atenção, pois são poucas as estruturas primárias depositadas e/ou publicadas sobre estas enzimas, e menos ainda as estruturas cristalográficas (DU & CLEMETSON, 2002; STABELI *et al.*, 2006).

Na comparação entre as LAAOs de *B. jararacussu* e *C. rhodostoma* pela modelagem molecular podemos verificar 80% de similaridade entre as duas proteínas (Fig. 10A e 10B).

A ênfase principal do presente projeto são as avaliações tóxicas e farmacológicas, visando assim testar a enzima visualizando-a como um futuro fármaco. As avaliações funcionais realizadas foram: Indução do edema, miotoxicidade, hemorragia, ação coagulante, fibrinogenolítica, antitumoral, bactericida, leishmanicida e tripanocida.

A indução do edema trouxe resultados bastante interessantes, onde avaliando-se a Bjussu-LAAO nas doses de 10, 25 e 50 µg/animal não foi constatada ação edematogênica. No entanto na dose de 100 µg de

BjussuLAAO/animal apresentou edema significativo mas muito diferente do edema induzido pelas fosfolipases A₂. O pico do edema não foi observado nos primeiros 30 minutos após a aplicação da toxina, mas 4 horas após (Fig. 12). Uma explicação encontrada para este fato é que as LAAOs apresentam significativa similaridade com a proteína indutora de interleucina-4 (RAYBEKAS & MASSEY, 1998). Estas interleucinas estão envolvidas na inflamação e reações alérgicas (DIASIO & LoBUGLIO, 1996; INSEL, 1996), e pesquisas recentes demonstram a ação das interleucinas em excesso no organismo promovendo a degradação da cartilagem bovina, podendo induzir artrite e artrose (WILLIAMS *et al.*, 2003).

A enzima BjussuLAAO não apresentou atividade miotóxica mesmo em doses bastante elevadas. Comparando a miotoxicidade induzida pela toxina BthTX-I verificamos que apenas 50 µg BthTX-I/animal foi capaz de induzir alta atividade miotóxica e 100 µg BjussuLAAO/animal não induziu aumento da enzima CK (Fig. 13).

A atividade hemorrágica foi realizada com grande apreensão, pois algumas LAAOs apresentam tal atividade (SAKURAI *et al.*, 2003). Esta atividade foi desenvolvida comparativamente com o veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e verificamos que nenhuma das doses de BjussuLAAO avaliadas induziram hemorragia (Fig. 14 e 15).

Como mostrado na Figura 16, a enzima BjussuLAAO apresentou um interessante efeito coagulante, não tão potente como os fatores coagulantes isolados de outras serpentes do gênero *Bothrops*, mas com uma ação que não pode e não deve ser desprezada. Este pode ser um dado interessante nos estudos comparativos de análise estrutural com as serino-proteases, verificando a

diferença da ação e quais os sítios de ação para esta atividade. A concentração da BjussuLAAO para coagular o plasma em 1 minuto foi 0,5 µg/uL, aplicando um total de 12,5 µg de BjussuLAAO nos 200 µL do plasma humano. A figura também demonstra uma atividade coagulante dose dependente, onde ocorre uma diminuição gradativa do tempo de coagulação conforme aumenta a concentração da enzima.

Pelo fato da enzima BjussuLAAO induzir a coagulação, avaliamos sua ação sobre o fibrinogênio. Primeiro testamos em diferentes concentrações e verificamos que, mesmo em baixas concentrações, ela degradou a banda alfa do fibrinogênio (Fig. 17A). Em seguida, avaliamos a degradação pelo tempo de incubação (Fig. 17B), e observamos que, mesmo no menor tempo de incubação (15 min), a enzima degradou totalmente a banda alfa do fibrinogênio mas, mesmo em altas concentrações e tempos prolongados de incubação, a enzima não degradou as outras duas bandas (beta e gama). Os dados obtidos com a atividade fibrinogenolítica são bastante interessantes porque as LAAOs de outros gêneros de serpentes não apresentaram esta peculiaridade, reveladas apenas pelas LAAOs isoladas dos venenos do gênero *Bothrops* (*B. alternatus*, *B. moojeni* e *B. jararacussu*) que foram isoladas até o momento. Esta atividade, pelo fato de ser inédita, deve ser mais explorada, avaliamos a ação da BjussuLAAO sobre o fibrinogênio com a adição de inibidores de serino e metaloprotease (Fig. 18), pretendemos avaliá-la separadamente com adição de outros inibidores de enzimas para demonstrar que a ação é própria das LAAOs isoladas deste gênero de serpentes.

A ação citotóxica das LAAOs já foi estudada (SOUZA *et al.*, 1999; AHN *et al.*, 1997), demonstrando que esta atividade é um dado bastante interessante nos experimentos realizados com as LAAOs. Avaliamos a ação citotóxica da BjussuLAAO em células tumorais SKBR3 e em células saudáveis. Os dados obtidos foram bastante interessantes, devido à concentração usada da enzima para obter as ações citotóxicas, demonstrando ser uma substância extremamente eficaz no combate às células tumorais. A figura 19 demonstra esses dados na forma de gráfico, onde 0,5 mg de BjussuLAAO, apresentou 100% de citotoxicidade em células tumorais mas também apresentou 90% de citotoxicidade em células saudáveis, demonstrando ser inviável para um futuro fármaco antitumoral, mas com 0,05 mg de BjussuLAAO, uma concentração dez vezes menor que a anterior, ela apresentou 90% de citotoxicidade em células tumorais e apenas 32% de citotoxicidade em células saudáveis, demonstrando ter uma afinidade maior para células tumorais, o que viabiliza a continuação da pesquisa com outras variedades de tumores e também testes *in vivo*.

A ação sobre as bactérias *E. coli* e *S. aureus* demonstraram que a BjussuLAAO tem ação bactericida diminuindo significativamente o número de colônias quando incubada junto com as bactérias pelo tempo de 60 minutos (Fig. 20). Com esta ação a BjussuLAAO pode ser classificada como “antibiotic-like”, em português a melhor expressão seria “antibiótico símile”; uma denominação criada, para substâncias com propriedades antibacteriana, porém produzidas por seres vivos superiores (FONSECA, 1986). Quando comparada a ação com outras drogas bactericidas, verifica-se que a BjussuLAAO não é tão potente quanto as drogas bactericidas já existentes no mercado como gentamicina, tetraciclina e

ampicilina, segundo dados apresentados por Fonseca (1986) demonstrando alguns antibióticos com ação bactericida sobre *E. coli* e *S. aureus* em baixas concentrações. Outro fato interessante é a ação mais eficaz da enzima sobre a bactéria *E. coli* principalmente com 60 minutos de incubação.

Para atividade antiparasitária utilizamos os parasitas *T. cruzi*, *L. donovani*, *L. amazonensis*, *L. braziliensis* e *L. major*. A ação leishmanicida apresentada na Figura 21 demonstra que a enzima BjussuLAAO atuou sobre todas as espécies de *Leishmanias* avaliadas, ou seja, as *L. amazonensis*, *L. braziliensis*, *L. donovani* e *L. major*. A enzima teve excelente ação sobre a espécie *L. braziliensis*, onde na menor concentração (0,2 µg/mL) a enzima apresentou ação sobre 77% dos parasitas.

A ação antiparasitária demonstrada na atividade tripanocida apresenta ótimos resultados (Fig. 22), pois dificilmente uma droga chega a ultrapassar 60% de lise na forma tripomastigota do parasita *T. cruzi*. Se compararmos estes resultados com os obtidos por Graef *et al.* (2000), verificamos que das 9 drogas testadas (eriodictiol, ramazina, velutina, homoeridictiol, diidroisorametina, crisoriol, centraterina, goiazensolida e licnoforolida B) apenas três, na maior concentração utilizada (eriodictiol, centraterina e goiazensolida), ultrapassaram a lise de 60%. Estes resultados enaltecem os valores obtidos com a enzima BjussuLAAO.

As avaliações funcionais realizadas nos permitem afirmar que a classe de enzimas LAAO apresenta grande interesse farmacológico. A enzima BjussuLAAO apresentou três ações farmacológicas que, sem dúvida, coloca esta enzima como uma das substâncias mais promissoras para a clínica médica. A BjussuLAAO apresentou ação antitumoral, bactericida e antiparasitária. Até o momento existem

antibióticos que apresentam também ação antiparasitária (anfotericina B, tetraciclina, aminosidina, entre outros) e existem antibióticos com ação antitumoral (mitomicinas, adriamicina, entre outros), mas uma substância com as três ações farmacológicas atuando significativamente em todas elas, são resultados extremamente promissores. Futuramente será de grande interesse da indústria farmacêutica, que busca um grande desenvolvimento biotecnológico para obtenção em grande escala desta classe de proteína.

Ernest Francois Auguste Fourneau
realizou grandes pesquisas como
desenvolvimento da quimioterapia

6 – CONCLUSÃO

Os resultados obtidos no presente trabalho permitem algumas conclusões: A BjussuLAAO foi isolada em três etapas cromatográficas, onde a maior dificuldade reside na autólise significativa da mesma. Assim deve-se prestar atenção na preparação das soluções tampões, principalmente com o pH. A grande vantagem desta metodologia é, não utilizar o HPLC para a purificação, pois trata-se de um equipamento de alto valor, mas três etapas cromatográficas bem conhecidas, menos agressivas e mais produtivas.

Na caracterização bioquímica, a BjussuLAAO apresenta-se como uma típica L-aminoácido oxidase, com massa molecular relativa de 61000, pI 5,8, apresentando resultados muito parecido com outras LAAOs descritos na literatura científica. A seqüência N-terminal e o cDNA demonstra tratar-se de uma LAAO do gênero *Bothrops*, demonstrando seqüências extremamente parecidas.

A enzima BjussuLAAO não apresenta atividade miotóxica e hemorrágica, o que, para a área médica e farmacêutica, é bastante interessante, pois demonstra não agredir as fibras musculares e vasculares do organismo. Apresenta-se com alta atividade coagulante e é capaz de induzir edema de pata, o que nos impulsiona a estudar mais detalhadamente a ação desta proteína nestas atividades. A enzima apresentou grande ação antitumoral com alta citotoxicidade em células tumorais em baixas concentrações, demonstrando este ser até o momento o principal efeito farmacológico avaliado pelo nosso grupo de pesquisa. A ação bactericida apresentado pela enzima fica aquém dos fármacos já existentes no mercado farmacêutico. A enzima BjussuLAAO apresentou ação leishmanicida sobre todas as espécies de *Leishmanias* testadas com principal

ação sobre a espécie *L. braziliensis*, onde na menor concentração apresentou lise de aproximadamente 80 % do parasita. Também apresentou ação tripanocida, demonstrando grande efeito antiparasitário.

Os resultados obtidos sugerem que se trata de uma droga multifuncional e provavelmente no futuro, promoverá uma grande busca por maior obtenção desta enzima para o uso no comércio químico-farmacêutico. Trata-se de uma proteína com alto peso molecular (61.000) que dificilmente poderá ser sintetizada quimicamente. Para as pesquisas futuras seria interessante avaliar os sítios da proteína que atuam nas ações farmacológicas e tentar clivar a proteína, verificando se ela mantém as atividades e qual segmento apresenta as atividades farmacológicas e dependendo do tamanho do mesmo, sua síntese será possível.

7 – REFERÊNCIAS

BIBLIOGRÁFICAS

ABE, Y.; SHIMOYAMA, Y.; MUNAKATA, H.; ITO, J.; NAGATA, N.; OHTSUKI, K. Characterization of an apoptosis-inducing factor in Habu snake venom as a glycyrrhizin (GL)-binding protein potentially inhibited by GL in vitro. **Biol. Pharm. Bull.**, v.21, p.924-927, 1998.

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, p.911-919, 1997.

AMARAL, A. **Serpentes do Brasil**: iconografia colorida. 2^a ed., Ed. Melhoramentos, São Paulo, 1977.

ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M.; ÂNGULO, Y.; DIAZ, C.; LOMONTE, B.; GUTIERREZ, J.M.; GIGLIO, J.R. Myotoxic phospholipases A(2) in *Bothrops* snake venoms: effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v.82, p.755-63, 2000.

ARANTES, E.C.; RICCIOPPO NETO, F.; SAMPAIO, S.V.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R. Isolation and characterization of TsTX-V, a new neurotoxin from *Tityus serrulatus* scorpion venom which delays the inactivation of Na⁺ channels. **Biochem. Biophys. Acta.**, v.1199, p.69-75, 1994.

ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P.; ASPERTI, M.C.A.; MANDELBAUM, F.R. Isolation of the major proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops moojeni* (caissaca). **Toxicon**, v.23, p.691-706, 1985.

BARRAVIERA, B. **Venenos Animais**: uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUB, cap.63 p.97-105, 1994.

BARRAVIERA, B.; PEREIRA, P.C.M. Acidentes por serpentes do gênero *Bothrops*, em: **Venenos**: Aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de Janeiro, EPUB, p.411, 1999.

BARSBY, T. Drug discovery and sea hares: bigger is better. **Trends in Biotech.**, v.24, p.1-3, 2006.

BATINA, M.F.C.; GIGLIO, J.R.; SAMAPAI, S.V. Methodological care in the evaluation of the LD₅₀ and neutralization of the lethal effect of *Crotalus durissus terrificus* venom by plant *Peschiera fuschiaefolia* (Apocynaceae). **The J. of Venoms Animal and Toxins**, v.3, p.115-119, 1997.

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

BORTOLETO, R.K.; MURAKAM, M.T.; WATANABE, L.; SOARES, A.M.; ARNI, R.K. Purification, characterization and crystallization of Jararacussin-I, a fibrinogen-clotting enzyme isolated from the venom of *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v.40, p.1307-1312, 2002.

BRENER, Z. Therapeutic activity and criterion of cure on mice experimentally infected with *Trypanosoma cruzi*. **Rev. Inst. Med. Trop. São Paulo**, v.4, p.389-396, 1962.

CAMBILLAU, C.; FREY, M.; MOSSE, J.; GUERLESQUIM, F.; BRUSCHI, M. **Proteins**, v.4, p.63-70, 1988.

CARSON, M. **J. Appl. Cryst.**, v.24, p.958-961, 1991.

CHU, C.C.; PAUL, W.E. Interleukin 4-induced mouse B cell gene isolated by cDNA representational difference analysis. **Proc. Natl. Acad. Sci.** v.94, p.2507-2512, 1997.

CIRINO, G.; PEERS, S.H.; FLOWER, J.L.; PEPINSKY, R.B. Human recombinant lipocortin 1 has acute local anti-inflammatory properties in the rat paw oedema test. **Proc. Nat. Acad. Science**, v.86, p.3428, 1989.

COLES, C.J.; EDMONDSON, D.E.; SINGER, T.P. Reversible inactivation of L-amino acid oxidase. Properties of the three conformational forms. **J. Biol. Chem.** v.252, p.8035-8039, 1977.

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

CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETTA, P.M. D- and L-amino acid oxidases. In: Mueller, F. **Chemistry and Biochemistry of Flavoenzyme**, v.3, Ed. CRC Press, Boca Roton, p.69-94, 1992.

DAL PAI, V.; SANTO NETO, H. Ação dos venenos ofídicos sobre os tecidos animais. In: BARRAVIERA, B. **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro, Ed. EPUB, p.411, 1994.

DE CARVALHO, D.D.; MARANGONI, S.; NOVELLO, J.C. Primary structure characterization of *Bothrops jararacussu* snake venom lectin. **J. Protein Chem.**, v.21, p.43-50, 2002.

DE HAAS, G.H.; POSTEMA, N.M.; NIEUWENHUIZEN, W.; VAN DEENEN, L.L. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. **Biochem. Biophys. Acta**, v.159, p.103-117, 1968.

DIASIO, R.B.; LoBUGLIO, A.F. Imunomoduladores: Imunossupressores e imunoestimulantes. In: In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As bases farmacológicas da terapêutica**, Ed. Mc Gram Hill, ed. 9, p.953-965, 1996.

DOS SANTOS, M.C.; GONÇALVES, L.R.C.; FORTES-DIAS, C.L.; CURY, Y.; GUTIÉRREZ, J.M.; FURTADO, M.F. A eficácia do antiveneno botrópico-crotálico na neutralização das principais atividades do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Rev. Inst. Méd. Trop.**, v.34, p.77-83, 1992.

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

EDMAN, P.; BEGG, G. A protein sequenator. **Eur. J. Biochem.** v.1, p.80-91, 1967.
FONSECA, A.L. Antibióticos na Clínica Diária. **Ed. EPUME**, 2ª edição, p.427, 1986.

GEYER, A.; FITZPATRICK, T.B.; PAWELEK, P.D.; KITZING, K.; VRIELINK, A.; GHISLA, S.; MACHEROUX, P. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur. J. Biochem.**, v.268, p.4044-53, 2001.

GRAEL, C.F.F.; VICHNEWSKI, W.; DE SOUZA, G.E.P.; LOPES, J.L.C.; ALBUQUERQUE, S.; CUNHA, W.R. A study of the trypanomicidal and analgesic properties from *Lychnophora granmangolense* (Duarte) Semir & Leitão Filho. **Phytot. Res.**, v.14, p.203-206, 2000.

GUTIÉRREZ, J.M.; CHAVES, F. Efectos proteolítico, hemorrágico y mionecrótico de los venenos de serpientes costrricenses de los géneros *Bothrops*, *Crotalus* y *Lachesis*. **Toxicon**, v.18, p.315-321, 1980.

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

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.367-370, 1984.

GUTIÉRREZ, J.M.; NUÑEZ, J.; DÍAZ, C.; CINTRA, A.C.O.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GIGLIO, J.R. Skeletal muscle degeneration and regeneration after injection of BthTX-II, a phospholipase A₂ isolated from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*. **Exp. Mol. Pathol.**, v.55, p.217-229, 1991.

GUTIÉRREZ, J.M.; ROMERO, M.; NUÑEZ, J.; CHAVES, F.; BORKOW, G.; OVADIA, M. 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.

HEMAN-ACKAH, S.M. Microbial kinetics of drug action against gram-positive and gram-negative organism. II: effect of clindamycin on *Staphylococcus aureus* and *Escherichia coli*. **J. Pharm. Sci.**, v.64, p.1612-1620, 1975.

HOFMANN, H.; BON, C. Blood coagulation induced by the venom of *Bothrops atrox*. 2. Identification, purification and properties of two factor X activators. **Biochemistry**, v.26, p.780-787, 1987.

HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; RODRIGUES-SIMIONI; GIGLIO, J.R. Fractionation of *Bothrops jararacussu* snake venom partial chemical characterization and biological activity of bothropstoxin. **Toxicon**, v.26, p.615-627, 1988.

INSEL, P.A. Fármacos analgésico-antipiréticos e antiinflamatórios e medicamentos usados no tratamento da gota. In: HARDMAN, J.G.; LIMBIRD, L.E. **As bases farmacológicas da terapêutica**, Ed. Mc Gram Hill, ed. 9, p.450-480, 1996.

ITOH, N.; TANAKA, N.; MIHASHI, S.; YAMASHIMA, I. Molecular cloning and sequence analysis of cDNA for batroxobin, a thrombin-like snake venom enzyme. **J. Biol. Chem.**, v.262, p.3132-3135, 1987.

ITZHAKI, R.F.; GILL, D.M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Anal. Biochem.**, v.9, p.401-410, 1964.

IZIDORO, L.F.; RIBEIRO, M.C.; SOUZA, G.R.; SANT'ANA, C.D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M.I.; GOULART, L.R.; BELEBONI, R.O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S.V.; SOARES, A.M.; RODRIGUES, V.M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v.14, p.7034-43, 2006.

KAPLER, G.M.; COBURN, C.M.; BEVERLEY, S.M. Stable transfection of the human parasite *Leishmania major* delineates a 30-kilobase region sufficient for extrachromosomal replication and expression. **Mol. Cell Biol.**, v.10, p.1084-94, 1990.

KASHIMA, S.; ROBERTO, P.G.; SOARES, A.M.; ASTOLFI-FILHO, S.; PEREIRA, J.O.; GIULIATI, S.; FARIA, M. Jr.; XAVIER, M.A.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R.; FRANÇA, S.C. Analysis of *Bothrops jararacussu* venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects: l-gene expression profile of highly expressed phospholipase A2. **Biochimie**, v.86, p.211-9, 2004.

KONDO, H.; KONDO, S.; IKEZAWA, H.; MURATA, R.; OHSAKA, A. Studies on the quantitative method for the determination of hemorrhagic activity of Habu snake venom. **Jpn. J. Med. Sci. Biol.**, v.13, p.43-51, 1960.

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

LANDUCCI, E.C.T.; CASTRO, R.C.; PEREIRA, M.F.; CINTRA, A.C.O.; GIGLIO, J.R.; MARANGONI, S.; OLIVEIRA, B.; CIRINO, G.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G. Mast cell degranulation induced by two phospholipase A₂ homologues: Dissociation between enzymatic and biological activities. **European J. of Pharm.**, v.343, p.257-263, 1998.

LI, Z.Y.; YU, T.F.; LIAN, E.C. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from King cobra (*Ophiophagus hannah*) venom and its effects on human platelet aggregation. **Toxicon**, v.32, p.1349-1358, 1994.

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFURST, M.; AU, L. C.; GHISLA, S. L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **Eur. J. Biochem.**, v.268, p.1679-86, 2001.

MACPHERSON, A. Preparation and analysis of protein crystals. New York: Wiley, 1982.

MANDELBAUM, F.R.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. Characterization of two hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops neuwiedi* (jararaca pintada). **Toxicon**, v.22, p.193-206, 1984.

MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF₂, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: **Animal, Plant and Microbial Toxins**, Ed. Plenum Press, p.111-121, 1976.

MASUDA, S.; ARAKI, S.; YAMAMOTO, T.; KAJI, K.; HAYASHI, H. Purification of a vascular apoptosis-inducing factor from hemorrhagic snake venom. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v.235, p.59-63, 1997.

MAZZI, M.V.; MARCUSSU, S.; CARLOS, G.B.; STABELI, R.G.; FRANCO, J.J.; TICLI, F.K.; CINTRA, A.C.O.; FRANÇA, S.C.; SOARES, A.M.; SAMPAIO, S.V. A new hemorrhagic metalloprotease from Bothrops jararacussu snake venom: isolation and biochemical characterization. **Toxicon**, v.44, p.215-223, 2004.

MEBS, D.; EHRENFELD, M.; SAMEJIMA, Y. Local microtyng effect of snake venoms on skin and muscle: relationship to serum creatine kinase. **Toxicon**, v.21, p.393-404, 1983.

MENGEL, J.; DARE, L.; DARE, G.M.; DELGADO, M.; NOMIZO, A.; SILVA, J.S.; CAMPOS-NETO, A. An activated murine B cell lymphoma line (A-20) produces a factor-like activity which is functionally related to human natural killer cell stimulatory factor. **Eur. J. Immunol.**, v.22, p.3173-8, 1992.

MORENO, J.J.; FERRER, X.; ORTEGA, E.; CARGANICO, G. PLA₂-induced oedema in rat skin and histamine release in rat mast cell. Evidence for involvement of lysophospholipids in the mechanism of action. **Agents Action**, v.36, p.258-263, 1992.

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

NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S.; SOUSA e SILVA, M.C.; RIBEIRO de BARROS, M.A.; MORENA, P. The inactivating effect of *Bothrops jararaca* and *Waglerophis merremii* snake plasma on the coagulant activity of various snake venoms. **Toxicon**, v.21, p.239-246, 1983.

NISHIDA, S.; FUJIMURA, Y.; MIURA, S.; OZAKI, Y.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; YOSHIDA, E.; SUGIMOTO, M.; YOSHIOKA, A. Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogen-clotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v.33, p.1843-1849, 1994.

OHSAKA, A.; OMORI-SATOH, T.; KONDO, S.; MURATA, R. Biochemical and pathological aspects of hemorrhagic principles in snake venoms with special reference to Habu (*Trimeresurus flavoviridis flavoviridis*) venom. **Mem. Inst. Butantan**, v.33, p.193-205, 1966.

PAINE, M.J.; DESMOND, H.P.; THEAKSTON, R.D.; CRAMPTON, J.M. Purification, cloning and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem.**, v.267, p.22869-22876, 1992.

PAL, J.K.; JOSHI-PURANDORE, M. Dose-dependent differential effect of hemin on protein synthesis and cell proliferation in *Leishmania donovani* promastigotes cultured in vitro. **J. Biosci.**, v.26, p.225-231, 2001.

PAWELEK, P.; CHEAH, J.; COULOMBE, R.; MACHEROUX, P.; GHISLA, S.; VRIELINK, A. The structure of L-amino acid oxidase reveals the substrate trajectory into an enantiomerically conserved active site. **Embo Journal**, v.19, p.4204-15, 2000.

PESSATTI, M.; FONTANA, J.D.; FURTADO, M.F.; GUIMARÃES, M.F.; ZANETTE, L.R.; COSTA, W.T.; BARON, M. Screening of *Bothrops* snake venom for L-amino acid oxidase activity. **Appl. Biochem. Biotechnol.**, v.51/52, p.197-210, 1995.

PIZZI, T. Inmunologia de la enfermedad de Chagas. **Universidad de Chile**, Santiago, 1957.

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

QUEIROZ, L.S.; PETTA, C.A. Histopathological changes caused by venom of urutu snake (*Bothrops alternatus*) in mouse skeletal muscle. **Rev. Inst. Med. Trop.**, v.26, p.247-253, 1984.

RAYBEKAS, A.A.; MASSEY, V. Primary structure of the snake venom L-amino acid oxidase shows high homology with the mouse B cell interleukin 4-induced protein. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.248, p.476-478, 1998.

RODRIGUES, V.; SOARES, A.M.; GUERRA-SA, R.; FONTES, M.R.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of neuwidase, a nonhemorrhagic fibrin(ogen)olytic metalloprotease from *Bothrops neuwiedi* snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.381, p.213-224, 2000.

ROSENFELD, G. Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America. In: **Venomous Animals and their Venoms**. v.2, Ed. W. Burcherl and E. Bucley, New York, p.345, 1971.

SAKURAI, Y.; SHIMA, M.; MATSUMOTO, T.; TAKATSUKA, H.; NISHIYA, K.; KASUDA, S.; FUJIMURA, Y.; YOSHIOKA, A. Anticoagulant activity of M-LAO, L-Amino acid oxidase purified from *Agkistrodon halys blomhoffii*, through selective inhibition of factor IX. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1649, p.51-57, 2003.

SAKURAI, Y.; TAKATSUKA, H.; YOSHIOKA, A.; MATSUI, T.; SUZUKI, M.; TITANI, K.; FUJIMURA Y. Inhibition of human platelet aggregation by L-amino acid oxidase purified from *Naja naja kaouthia* venom. **Toxicon**, v.39, p.1827-1833, 2001.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RONNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom. **Biochim. Biophys. Acta**, v.1764, p.707-14, 2006.

SANT'ANA, C.D. Caracterização funcional e estrutural de uma nova serinoprotease do veneno de *Bothrops jararacussu*. **Dissertação de mestrado apresentado à FCFRP-USP**, p.109, 2005.

SHAHAM, N.; BDOLAH, A. L-amino acid oxidase from *Vipera palaestinae* venom: Purification and assay. **Com. Biochem. Physiol.**, v.46, p.691-698, 1973.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULA, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.373, p.7-15, 2000.

SOUZA, D.H.; EUGENIO, L.M.; FLETCHER, J.E.; JIANG, M.S.; GARRATT, R.C.; OLIVA, G.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. 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.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G.B.; PIETRO, R.C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; GIGLIO, J.R.; OLIVEIRA, E.B.; SOARES, A.M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v.12, p.2881-2886, 2004.

STABELI, R.G.; MAGALHAES, L.M.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; OLIVEIRA, E.B. Antibodies to a fragment of the *Bothrops moojeni* L-amino acid oxidase cross-react with snake venom components unrelated to the parent protein. **Toxicon**, v.46, p.308-17, 2005.

STABELI, R.G.; AMUI, S.F.; SANT'ANA, C.D.; PIRES, M.G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M.C.; ROMAO, P.R.; GUERRA-SA, R.; VIEIRA, C.A.; GIGLIO, J.R.; FONTES, M.R.; SOARES, A.M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comp. Biochem. Physiol. C. Toxicol. Pharmacol.**, v.142, p.371-81, 2006.

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.

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

TAKATSUKA, H.; SAKURAI, Y.; YOSHIOKA, A.; KOKUBO, T.; USAMI, Y.; SUZUKI, M.; MATSUI, T.; TITANI, K.; YAGI, H.; MATSUMOTO, M.; FUJIMURA, Y. **Bioch. Biophys. Acta**, v.1544, p.267-277, 2001.

TAN, N.H.; CHOY, S.K. The edema inducing activity of *Ophiophagus hannah* (king cobra) venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**, v.32, p.539-544, 1994.

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

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, p.967-973, 1992.

TEMPONE, A.G.; ANDRADE Jr., H.F.; SPENCER, P.J.; LOURENÇO, C.O.; ROGERO, J.R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kills *Leishmania* spp. With hydrogen peroxide generated by its L-amino acid oxidase. **Biochem. Biophys. Res. Commun.** v.280, p.620-624, 2001.

TORII, S.; NAITO, M.; TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from Western diamondback rattlesnake venom. **J. Biol. Chem.** v.272, p.9539-9542, 1997.

TOYAMA, M.H.; TOYAMA, D. de O.; PASSERO, L.F.; LAURENTI, M.D.; CORBETT, C.E.; TOMOKANE, T.Y.; FONSECA, F.V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P.P.; BERIAM, L.O.; MARTINS, M.A.; MONTEIRO, H.S.; FONTELES, M.C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v.47, p.47-57, 2006.

TU, A.T. **Venoms**: chemistry and molecular biology. Ed. John Wiley & Sons, New York, p.560, 1977.

VALENTIN, E.; LAMBEAU, G. What can venom phospholipase A₂ tell us about the functional diversity of mammalian secreted phospholipase A₂?. **Biochimie**, v.82, p.815-831, 2000.

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

VIDAL, J.C.; STOPPANI, A.O.M. Isolation and purification of two phospholipases A from *Bothrops* venoms. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.145, p.543-549, 1971.

VIDAL, J.C.; CATTANEO, P.; STOPPANI, A.O.M. Some characteristic properties of phospholipases A₂ from *Bothrops neuwieddi* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.151, p.168-179, 1972.

YANG, Y.Z.; RANZ, A.; PAN, H.Z.; ZHANG, Z.N.; LIN, X.B.; MESHNICK, S.R. Daphnetin: a novel antimalarial agent with in vitro and in vivo activity. **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.46, p.15-20, 1992.

WANG, J.P.; TENG, C.M. Rat paw oedema and mast cell degranulation caused by two phospholipase A_2 enzymes isolated from *Trimeresurus mucrosquamatus* venom. **J. Pharm. Pharmacol.**, v.42, p.846-850, 1990.

WILLIAMS, A.; OPPENHEIMER, R.A.; GRAY, M.L.; BURSTEIN, D. Differential recovery of glycosaminoglycan after IL-1 induced degradation of bovine articular cartilage depends on degree of degradation. **Arthrt. Res. Therapy**, v.5, p.97-105, 2003.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (1981) Progress in Characterization of Venoms and Standardization of Antivenoms. Geneva: World Health Organization.

ZANOTTI, A.; AZZONE, G.F. Safranin as membrane potential probe in rat liver mitochondria. **Arch. Biochem. Biophys.**, v.201, p.255-265, 1980.

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

ZHANG, Y.J.; WANG, J.H.; LEE, W.H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG, Y.T.; ZHANG, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Bioch. Biophys. Res. Comm.**, v.309, p.598-604, 2003.