UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

“Isolamento e caracterização bioquímica do componente presente no veneno de *Rhinella schneideri* com atividade sobre o sistema complemento”

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Pós-graduando: Fernando Antonio Pino Anjolette

Orientador (a): Prof^ª Dr^ª Eliane Candiani Arantes

Ribeirão Preto

2011

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

Anjolette, Fernando Antonio Pino

Isolamento e caracterização bioquímica do componente presente no veneno de *Rhinella schneideri* com atividade sobre o sistema do complemento. Ribeirão Preto, 2011. 100 p.: il. ; 30 cm.

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

Orientador (a): Arantes, Eliane Candiani.

1. *Rhinella schneideri*. 2. Sistema Complemento. 3. Ribeirão Preto-SP.

FOLHA DE APROVAÇÃO

Fernando Antonio Pino Anjolette

“Isolamento e caracterização bioquímica do componente presente no veneno de *Rhinella schneideri* com atividade sobre o sistema complemento”.

Dissertação de Mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Toxicologia para obtenção do Título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Toxicologia

Orientador (a): Prof^ª Dr^a Eliane Candiani Arantes

Aprovado em:

Banca Examinadora

Prof^º Dr^º: _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof^º Dr^º: _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Prof^º Dr^º: _____

Instituição _____ Assinatura: _____

Dedico esta dissertação primeiramente a DEUS, pelo dom da vida.

Dedico especialmente aos meus pais, Antonio Edes e Maria de Fátima e ao meu grande irmão, Cristiano, pelo exemplo de vida que são e pelo enorme apoio que sempre recebi. “Família, sem o apoio de vocês eu não teria conquistado mais esta etapa da minha vida a qual dedico exclusiva e inteiramente a vocês”. Não foi apenas o apoio financeiro ou de palavras, foram outras formas que sempre recebi, desde aquela oração até mesmo aquele olhar quando eu os via e os deixava ao retornar aos meus estudos. Se hoje “andei” um pouco mais à frente nesta caminhada é porque recebi forças e pensamentos positivos de vocês, minha família, meu mundo.

Ao término desta etapa da minha vida, reaprendi o imenso valor de se ter uma família. Famílias não são “perfeitas”, não são ideais. São reais. Famílias, acima de se ter um pai, mãe e irmãos, acima de ser apenas biológica, são pessoas em quem se pode confiar. Famílias são combinações de amor, sinceridade, esperança, fé, respeito... Elas são a parte que completa a vida. Aos poucos percebemos que o que realmente dá sentido e impulsiona a vida é a família, independentemente se é de laços sanguíneos ou construídas pelo poder da escolha.

Agradecimentos

À Professora Dr^a Eliane Candiani Arantes pela orientação, disponibilidade, críticas e sugestões relevantes durante a orientação.

À Professora Dr^a Luciana Crott pela paciência e disponibilidade nos momentos de dúvidas.

À Professora Dr^a Marta Chagas Monteiro por ter acreditado em mim e por incentivar meus primeiros passos na carreira científica. Pessoas como a professora Marta, que soube ser humana em todos os momentos, são raras no mundo científico, pois estas sabem ser humanas em todos os momentos.

Aos companheiros de pós-graduação do laboratório de Toxinas Animais: Camila Takeno Cologna, Mateus Amaral Baldo, Franciele Cordeiro e Felipe Cerni. Obrigado pelo companheirismo durante o período deste trabalho. Um agradecimento especial ao colega Felipe Cerni, pelas conversas construtivas e pela ajuda nos detalhes da capa desta dissertação.

Aos alunos de Iniciação Científica: Amanda Machado, Gisele Wiesel, Tibério Perini, Ernesto Lopes, Priscila Shibao e Márcio Perino. Sucesso e muita paciência nesta caminhada. Obrigado pelos bons momentos!

Aos colegas de pesquisa que passaram pelo laboratório: Ana Lúcia Zimbardi, Vinícius Adriano Coelho, Luana Denardi, Ana Paula Nunes, Gabriel Giassetti, Veridiana Pansiera e Vinícius Vitale que hoje estão seguindo suas vidas em outros lugares. Sorte a todos vocês!

Aos colegas do LCP (Laboratório de Cristalografia de Proteínas): Ricardo de Pádua, Patrícia Feliciano, Mateus Pinheiro, Joane Rustiguel, Renata Pessanha, Aline de Souza e Juliana Costacurta, pela ajuda e convívio harmonioso.

À especialista e amiga do laboratório de Toxinas Animais, Karla de Castro Figueiredo Bordon, por toda a disponibilidade e apoio. Karlinha, minha gratidão por todo este tempo de convívio. Independente de onde eu estiver, saber que existem pessoas como você me faz crer que o mundo tem alguma esperança de ser melhor. Se hoje sou o que sou, meus muitos agradecimentos porque sem você eu não chegaria aqui, onde estou. Obrigado pela sinceridade na amizade e por sempre estar por perto. Sentirei saudades.

À especilista Ana Elisa Caleiros Seixas Azzolini (Aninha) e à Pós-doutoranda Ana Paula do laboratório de Bioquímica da FCFRP-USP. Obrigado por todo ensinamento, paciência e disponibilidade para a realização deste trabalho.

À Maria Aparecida de Almeida Segato (Cidinha), secretária do Departamento de Física e Química pelo auxílio em praticamente tudo que sempre precisei. Obrigado Cidinha, muito obrigado por toda a ajuda e por toda esta simpatia verdadeira.

Aos Biólogos Luis Henrique e Denise pela amizade durante a realização desta dissertação.

A secretária do programa de pós-graduação da FCFRP-USP, Ana Lúcia Turatti, pela imensa paciência nos atendimentos e pela simpatia em sempre atender com um sorriso, mesmo quando eu chegava desesperado atrás de alguma informação. Ana, meu muito obrigado.

À técnica Tânia Ogasawara e aos alunos de mestrado: Juliana Pereira e Andréa do Laboratório de Imunologia Clínica por toda ajuda e amizade.

À amiga Caroline Marroni Cremonese pela amizade e por caminhar comigo durante boa parte deste trabalho. Sou muito grato por toda a ajuda e apoio que recebi dentro e fora da pós-graduação. Obrigado pelos momentos maravilhosos que passamos juntos. Não há como esquecer as risadas e papos que tivemos. Sucesso!

À amiga Cristiane Bregge da Silva pela amizade e orientações de vida quando eu mais precisei. Alguns momentos nas nossas vidas esperamos que DEUS nos dirija respostas aos nossos questionamentos. Mesmo sem sabermos, Ele envia anjos capazes de apaziguar nossos corações. Bregge, minha gratidão por ser este anjo que, mesmo sem você perceber, mudou muita coisa na minha vida.

À amiga Flávia Pine Leite pela amizade e por todo apoio durante o tempo que estivemos juntos. Hoje, grande amiga, entendo que pessoas especiais passarão por nossas vidas e deixarão um pouco de si para sempre lembrarmos de que vale a pena acreditar e lutar por aquilo que se deseja. Flávia, grande exemplo de luta!

À pós-graduanda Taísa Manginelli do laboratório de Essencialidade de Metais pela amizade que, com certeza, levarei por onde eu estiver. Não acredito em coincidências, mas sim em providências. Se hoje tenho você ao meu lado não é pelo simples fato de ter apenas te conhecido. Acredito que DEUS coloca as pessoas certas nos momentos certos, assim como aconteceu quando a conheci. Sei que não estaremos sempre por perto, mas levarei um pedacinho teu aqui dentro, comigo, no coração.

Ao meu grande amigo e irmão Antônio Carlos Bragato Bergamaschi pelo apoio e pela caminhada até hoje. Não há como não te agradecer por estar sempre perto e sempre ser alguém em quem eu posso estar seguro quando eu não estou com minha família biológica. Hoje, caro amigo, você faz parte da família que eu pude escolher. Obrigado por tudo!

Às minhas amigas Adriana e Diana Kleinubing pelo incentivo desde meus primeiros passos na pesquisa até os dias de hoje. Ao som de Engenheiros do Hawai, uma amizade cresceu e se fortalece até hoje, mesmo que distantes, mesmo meses sem nos falarmos. Não há como se esquecer destas “meninas” que são um tesouro na minha vida. Saudade!

À minha querida japonesa, Nádia Fujikawa, pela grande amizade e companheirismo até hoje. Mesmo geograficamente longe, sei que você anda aqui do meu lado, sempre. Obrigado por toda ajuda. Sucesso!

Às amigas Daniele Pegorine e Kelly Rocha. Pessoas amigas como vocês fazem muita falta. Reuniões, festas, conversas, passeios...são um pouco de tudo que vivemos, além do grande apoio na caminhada e um ombro amigo que existe até hoje.

À minha grande amiga, Thaís Daniela Teixeira Morgado. Obrigado pela força e apoio e por esta amizade de mais de 15 anos. Amizade verdadeira!

Às amigas: Selma Figueiredo, Karina dos Santos, Cleônia de Souza e Fabianna Stathopoulos, pelo apoio e ânimo quando eu estava sem forças. Obrigado por estarem ao meu lado nesta longa caminhada.

Ao meu amigo Samuel pelo apoio e amizade durante estes anos. Obrigado pelo companheirismo e dedicação durante o caminhar desta dissertação.

Aos meus amigos e colegas não citados aqui. Obrigado pela presença na minha vida. Mesmo não citando todos, sei que vocês entenderão que nesta etapa da minha vida, apenas alguns estiveram diretamente caminhando comigo. Amo todos vocês, mesmo distantes!

À Fapesp (Fundação de Apoio a Pesquisa do Estado de São Paulo) pelo apoio financeiro.

A todos que estiveram direta e indiretamente relacionados com a realização deste projeto. Obrigado!

A vida me ensinou...
A dizer adeus às pessoas que amo, sem tirá-las do meu coração;
Sorrir às pessoas que não gostam de mim,
Para mostrá-las que sou diferente do que elas pensam;
Fazer de conta que tudo está bem quando isso não é verdade, para que eu possa acreditar que
tudo vai mudar;
Calar-me para ouvir; aprender com meus erros.
Final eu posso ser sempre melhor.
A lutar contra as injustiças; sorrir quando o que mais desejo é gritar todas as minhas dores
para o mundo.
A ser forte quando os que amo estão com problemas;
Ser carinhoso com todos que precisam do meu carinho;
Ouvir a todos que só precisam desabafar;
Amar aos que me machucam ou querem fazer de mim depósito de suas frustrações e desafetos;
Perdoar incondicionalmente, pois já precisei desse perdão;
Amar incondicionalmente, pois também preciso desse amor;
A alegrar a quem precisa;
A pedir perdão;
A sonhar acordado;
A acordar para a realidade (sempre que fosse necessário);
A aproveitar cada instante de felicidade;
A chorar de saudade sem vergonha de demonstrar;
Me ensinou a ter olhos para "ver e ouvir estrelas",
embora nem sempre consiga entendê-las;
A ver o encanto do pôr-do-sol;
A sentir a dor do adeus e do que se acaba, sempre lutando para preservar tudo o que é
importante para a felicidade do meu ser;
A abrir minhas janelas para o amor;
A não temer o futuro;
Me ensinou e está me ensinando a aproveitar o presente,
como um presente que da vida recebi, e usá-lo como um diamante que eu mesmo tenha que
lapidar, lhe dando forma da maneira que eu escolher.

(Charles Chaplin)

RESUMO

ANJOLETTE, F. A. P. **Isolamento e caracterização bioquímica do componente presente no veneno de *Rhinella schneideri* com atividade sobre o sistema complemento**. 2011. 100f - Dissertação (Mestrado), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2011.

Importantes estudos voltados para a análise das secreções de anfíbios fundamentam-se na grande quantidade de componentes biologicamente ativos presentes nas mesmas, tais como aminas biogênicas, esteróides, aminopolissacarídeos, glicosídeos, inibidores de proteases e diversos outros compostos, responsáveis pela complexa sintomatologia observada no envenenamento. O gênero *Bufo* apresenta diversas moléculas em suas excreções que podem ser divididas em categorias como aminas biogênicas, bufadienolídeos (bufogeninas), esteróides (bufotoxinas), alcalóides, peptídeos e proteínas. Marongio (2006) verificou que o veneno do sapo *Bufo paracnemis*, hoje classificado como *Rhinella schneideri*, apresenta componente ativo sobre a via clássica do sistema complemento (SC), necessitando de melhores estudos e caracterização. Os objetivos deste trabalho foram, portanto, o isolamento e caracterização química do componente do veneno de *Rhinella schneideri* responsável pelos efeitos observados sobre o sistema complemento. Para a purificação, o veneno foi inicialmente submetido a uma cromatografia catiônica (CM-Celulose-52), obtendo-se 7 frações denominadas C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7. A fração C1 foi cromatografada em resina aniônica (DEAE-SepharoseTM), resultando em 4 subfrações denominadas D1, D2, D3, e D4. A subfração D3 apresentou atividade sobre o sistema complemento e foi submetida a uma Gel Filtração (SephacrylTMS-200), fornecendo 5 subfrações denominadas S1, S2, S3, S4, e S5. As subfrações S2 e S5 induziram redução da atividade hemolítica das vias clássica/lectinas. Ambas apresentaram resultados positivos nos ensaios de migração de neutrófilos e imunoeletroforese bidimensional. No ensaio de capacidade geradora de SC5b-9, a subfração S2 apresentou maior significância frente as demais subfrações utilizadas. Visando esclarecer o mecanismo de ação das subfrações ativas sobre o sistema complemento, testes de determinação da atividade proteolítica ou inibitória de proteases (tripsina, quimotripsina e elastase) foram realizados. No entanto, nas concentrações utilizadas, as amostras não mostraram atividade proteolítica ou inibitória de protease. Os compostos isolados foram também submetidos ao sequenciamento amino-terminal inicial. Foi possível a identificação dos primeiros 15 aminoácidos da banda protéica majoritária do gel de poliacrilamida e 10 e 5 aminoácidos das subfrações S2 e S5, respectivamente. No entanto, os resultados de sequenciamento N-terminal apresentaram baixa confiabilidade, devido à baixa quantidade de material utilizada. Neste trabalho foram isolados e caracterizados dois compostos capazes de induzir a ativação do sistema complemento. Esta ação foi evidenciada, após exposição do soro humano normal às subfrações, por induzirem à formação do complexo SC5b-9 e aumentarem a migração de neutrófilos, provavelmente por induzirem a formação de fatores quimiotáticos. Este estudo permitiu avaliar melhor alguns componentes presentes na complexa mistura que é o veneno de *Rhinella schneideri*, que, no futuro, poderão se tornar ferramentas farmacológicas importantes para o estudo de diversas patologias relacionadas ao sistema complemento.

Palavras-chave: *Rhinella schneideri*, sistema complemento, proteases.

ABSTRACT

ANJOLETTE, F. A. P. **Isolation and biochemical characterization of a toxin from *Rhinella schneideri* poison with action on the complement system.** 2011. 100f - Dissertation (Master), Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, 2011.

Important studies focused on amphibians secretions analysis are based on large amount of biologically active components present in them, such as biogenic amines, steroids, polysaccharide amine, glycosides, protease inhibitors and several other compounds, responsible for complex symptomatology observed in the envenomation by *Bufo paracnemis*. The genus *Bufo* presents several molecules in their excretions that can be divided into categories such as biogenic amines, bufadienolides (Bufogenin), steroids (Bufotoxins), alkaloids, peptides and proteins. Marongio (2006) found in one of his studies the toad poison of *Bufo paracnemis*, now classified as *Rhinella schneideri*, has an active component of the classical pathway of the complement system (SC), which needs further studies and characterization. The purification process of this study was accomplished through cation chromatography (CM-Cellulose-52), and seven fractions were obtained, called C1, C2, C3, C4, C5, C6 e C7. The fraction C1 was chromatographed on anion-exchange resin (DEAE-SephacrylTM) resulting in 4 subfractions referred to as D1, D2, D3, and D4. The subfraction D3 showed activity on complement system and was subjected to gel filtration (SephacrylTMS-200) giving 5 subfractions termed S1, S2, S3, S4, and S5. The subfractions S2 and S5 induced reduction of the hemolytic activity of the classical/lectin pathway. Both showed positive results in the assays of migration of neutrophils and bidimensional immunoelectrophoresis. In the assay of generating capacity of SC5b-9, the subfraction S2 presented greater significance when compared to the other used subfractions. Aiming to clarify the action mechanism of the active subfractions on the complement system, tests of determination of the proteolytic or inhibitory activity of proteases (trypsin, chymotrypsin and elastase) had been done. However, in the used concentrations, the samples had not shown proteolytic or inhibitory activity of protease. The isolated compounds also had been submitted to the initial amino-terminal sequence. The identification of the first 15 aminoacids of the major proteinic band of the polyacrylamide gel and 10 and 5 aminoacids of the subfractions S2 and S5 was possible, respectively. However, the sequence of N-terminal results had presented low trustworthiness, due to the low amount of used material. In this work, were isolated and characterized two capable compounds to induce the activation of the complement system. This action was evidenced, after exposition of the normal human serum to the subfractions, for inducing to the formation of the SC5b-9 complex and will increase the migration of neutrophils, probably because they can induce the formation of chemotactic factors. This study allowed a better evaluation of some components present in the complex mixture which is the poison of *Rhinella schneideri*, that, in the future, important pharmacological tools for the study of diverse pathologies related the complement system.

Keywords: *Rhinella schneideri*, complement system, proteases.

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A pele de anfíbios é morfológica, bioquímica e fisiologicamente complexa, possuindo vasta utilidade na sobrevivência dos mesmos como, por exemplo, no processo respiratório, defesa contra microrganismos, regulação de água, anti-predatório, excreção, controle de temperatura, reprodução, camuflagem entre outras (CLARK et al., 1994; CLARKE, 1997; LAI et al., 2002).

Com mais de 4.550 espécies, a classe Amphibia divide-se em Anura (sapos e rãs) e Urodela (KLAASSEN, 2001; SAKATE; LUCAS DE OLIVEIRA, 2000). No Brasil, as espécies *Bufo marinus*, *B. typhoni*, *B. crucifer*, *B. ictericus*, *B. granulosus*, *B. ocellatus*, *B. rufus* e *Rhinela schneideri* são as mais abundantes. São observadas na água e em lugares úmidos, sendo os vertebrados terrestres mais abundantes em florestas tropicais, podendo ser encontrados também em regiões temperadas úmidas. Apresentam um sistema elaborado de glândulas cutâneas ao longo de sua superfície corporal, as quais produzem secreções relacionadas com a respiração, reprodução, proteção contra predadores, ressecamento e ação antimicrobiana. São secretadas em pequenas e contínuas quantidades, o que é considerado uma adaptação evolutiva desses animais na transição da água para a terra. (MONTI; CARDELLO, 1994; VITAL BRAZIL; VELLARD, 1926). Muitas das substâncias encontradas em anfíbios podem ser classificadas como “nocivas” ou “tóxicas” (DALY, 1995).

Na pele dos anfíbios são encontrados dois tipos de glândulas: as granulares ou serosas ou glândulas venenosas, que produzem uma secreção tóxica a um grande número de vertebrados (responsáveis pela defesa passiva do animal), e as glândulas mucosas que são, geralmente, menores que as glândulas granulares, diferenciando na natureza química de suas secreções. De acordo com a região do corpo em que se localizam, as glândulas serosas são divididas em parotóides (agregado de glândulas formando duas protuberâncias nas porções pós-orbitais, uma em cada lado do corpo), lombares e peitorais (Fig. 1).

Figura 1. (A) *Rhinella jimi* (fêmea) exibindo sua glândula parotóide direita localizada na região pós-orbital. (B) Glândula parotóide seccionada de acordo com um plano frontal. (C) Maior ampliação do corte seccional frontal da glândula parotóide (alvéolos). As setas indicam as paredes e os asteriscos indicam a região dos alvéolos que compõem a glândula parotóide (adaptado de JARED; ANTONIAZZI et al., 2009).

Estas glândulas apresentam múltiplos poros visíveis por onde o veneno espesso leitoso ou cremoso de cor branca (*Bufo marinus*) ou amarelada (*Rhinella schneideri*), que foi

elaborado e acumulado em seu alvéolo, é ejetado (Fig. 2). Possui cheiro fortemente alício no *Bufo crucifer* e quase inodoro nas demais espécies. A disposição cutânea dessas glândulas deve-se à necessidade de defesa do sapo contra os seus inimigos naturais. No *Bufo*, as glândulas parotóides contribuem também como uma forma de intimidação, uma vez que elas são semelhantes a “grandes olhos” (TOLEDO, JARED, 1996; VITAL BRAZIL, VELLARD, 1926).

Figura 2. (A) *Bufo marinus*. A seta maior indica a glândula parotóide localizada na região pós-orbital e a seta menor indica a secreção desta glândula. (B) Jatoss de veneno esguichando dos poros da glândula parotóide após compressão manual. Adaptado de Hutchinson e Savitzky, 2004) (A) e JARED, ANTONIAZZI et al., 2009 (B).

Taxonomicamente, o sapo *Rhinella schneideri* (Fig. 3), foi classificado primeiramente por Werner, em 1894, como *Bufo schneideri*. Posteriormente, Lutz, em 1925, apresentou uma nova classificação denominando-o *Bufo paracnemis*. Outras classificações foram apresentadas por diferentes autores até o momento. Müller e Hellmich (1936) classificaram esta espécie como *Bufo marinus paracnemis*; Freiberg (1942) como *Bufo paracnemis*; Casamiquela (1967) como *Bufo pisanoi*; Frank e Ramus (1995) como *Bufo schneideri*; Frost et al. (2006) como *Chaunus schneideri* e, em 2007, Chaparro, Pramuk e Gluesenkamp, como *Rhinella schneideri* (FROST, 2009).

Considerando esta última classificação, alteramos a denominação de *Bufo paracnemis* para *Rhinella schneideri*, inclusive no título deste projeto.

Figura 3. *Rhinella schneideri* (Laboratório de Toxinas Animais – FCFRP-USP).

As secreções da pele de anfíbios são ricas em componentes biologicamente ativos com grande potencial para o desenvolvimento de novos fármacos ou novas ferramentas farmacológicas para o estudo de diferentes sistemas biológicos. No entanto, a caracterização bioquímica e funcional dos seus componentes é uma etapa fundamental, que antecede os estudos sobre suas aplicações biotecnológicas.

Diversos estudos foram realizados visando o isolamento e caracterização de componentes bioativos presentes na pele de anfíbios em décadas passadas (ZHAO et al., 2005a). Muitos peptídeos bioativos da pele de anfíbios, entre eles peptídeos antibacterianos, foram isolados e bem caracterizados (PRATES; BLOCH JR., 2000). Compostos derivados das secreções da pele de sapos podem ser usados como analgésicos, medicamentos contra problemas cardíacos, multi-drogas para bactérias resistentes, HIV e câncer (GARD; HIPPARGI; GANDHARE, 2008).

Ambas as glândulas (granulares ou serosas ou venenosas e mucosas) secretam diversas substâncias bioativas, as quais compõem um sistema de defesa diferente do constituído pelas células T e B do sistema imune do anfíbio, além de deterem a capacidade de promover a síntese de peptídeos de baixa massa molecular com atividade antimicrobiana efetivos contra bactérias e fungos (FLEURYA, et al., 1998). Relatos de diversos estudos evidenciam que já foram isolados mais de cinquenta peptídeos antimicrobianos de anfíbios,

caracterizados principalmente por sua natureza catiônica e capacidade de lisar membranas de microrganismos. Muitos dos peptídeos isolados podem ser encontrados em indivíduos de gêneros diferentes, pertencentes ou não à mesma subfamília. Como exemplo pode ser citada a bombinina, descrita em 1970 como peptídeo antibacteriano e hemolítico, presente na pele de *Bufo variegata* (PRATES; BLOCH JR., 2000). Posteriormente, outras bombininas foram identificadas na secreção do mesmo anfíbio, diferenciando entre si na composição de resíduos de aminoácidos (MIGNOGNA et al., 1993). Na tabela 1, estão listados os principais peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados nas secreções da pele ou em outros órgãos de anfíbios anuros.

Peptídeos antimicrobianos liberados pelas peles de sapos são capazes de causar lise de muitas bactérias patogênicas, vírus, bactérias gram-positivas e gram-negativas, protozoários, leveduras e fungos. Tais peptídeos antimicrobianos possuem propriedades químicas características, como tamanho relativamente pequeno (20 a 46 resíduos de aminoácidos), natureza básica (rico em lisina ou arginina) e propriedades anfipáticas (NICOLAS; MOR, 1995).

Tabela 1. Principais peptídeos com atividade antimicrobiana encontrados nas secreções da pele ou em outros órgãos de anfíbios anuros.

PEPTÍDEOS	ANFÍBIOS ANUROS
Magaininas	<i>Xenopus sp.</i>
Bombininas	<i>Bombina sp.</i>
Dermaseptinas	<i>Phyllomedusa sp.</i>
Brevininas	<i>Rana brevipoda</i>
Caerinas	<i>Litoria sp.</i>
Gaegurinas	<i>Rana rugosa</i>
Rugosinas	<i>Rana rugosa</i>
Buforina	<i>Bufo bufo</i>
Ranalexinas	<i>Rana catesbeiana</i>
Xenoxinas	<i>Xenopus sp.</i>
Temporinas	<i>Rana temporaria</i>
Maculatinas	<i>Litoria genimaculata</i>
Esculentinas	<i>Rana esculenta</i>
Pipininas	<i>Rana pipiens</i>
PGLa	<i>Xenopus laevis</i>
Xenopsina (fragmento precursor)	<i>Xenopus laevis</i>
Levitídeo (fragmento precursor)	<i>Xenopus laevis</i>
Ceruleína (fragmento precursor)	<i>Xenopus laevis</i>
Ceruleína	<i>Litoria cerulea</i>
Frenatina	<i>Litoria infrafrenata</i>

Adaptado de Prates e Bloch Jr. (2000).

Para o gênero *Bufo*, as moléculas presentes nas secreções encontram-se divididas em diferentes categorias como aminas biogênicas, bufodienolides (bufogeninas), esteróides (bufotoxinas), alcalóides, peptídeos e proteínas (DALY et al., 1987; LAI et al., 2003). Os compostos básicos (aminas biogênicas) incluem adrenalina, noradrenalina, bufoteninas, dihidrobufoteninas e bufotionina. Os derivados esteroidais, incluem colesterol, ergosterol, γ -sistosterol, bufotoxinas e bufadienolídeos que são arenobufogenina, argentinogenina, bufalina, bafarenogina, bufotalina, bufotalinina, cinobufogenina, cinobufotalina,

desacetilbufotalina, desacetilcinobufotalina, gamabufotalina, hellebrigenina, jamacobufoginina, marinobufogenina, resibufogenina e telocinobufogenina (SAKATE; LUCAS DE OLIVEIRA, 2000).

Weil e Davis (1994) relatam que o veneno de sapos era utilizado por indígenas como alucinógeno durante seus rituais ou para a caça. Tradicionalmente, o mesmo é empregado por chineses em drogas como “*Chan Su*” (conhecida pelos japoneses por Senso) e *Yixin Wan*, que são utilizadas em tratamento de doenças cardíacas, como expectorante, diurético e até mesmo como remédio para dor de dente, mas que podem causar envenenamento devido à alta concentração de bufotoxinas (CHI et al., 1998).

Sinais clínicos de envenenamento são observados principalmente em pequenos animais, como cães (BREDFORD, 1974; SAKATE; LUCAS DE OLIVEIRA, 2000). Envenenamentos leves são caracterizados por irritação da mucosa oral e salivação, principalmente. Sinais clínicos como depressão, fraqueza, ataxia e movimentos em círculos, anormalidades no ritmo cardíaco, defecação e uremia juntamente com irritação da mucosa oral e salivação, caracterizam o quadro de envenenamento moderado. Já em envenenamento grave, observa-se irritação da mucosa oral, salivação, dor abdominal, depressão respiratória, pupilas não responsivas à luz, convulsões, anormalidades no ritmo cardíaco, sinais de edema pulmonar e cianose, culminando com a morte (SAKATE; LUCAS DE OLIVEIRA, 2000). Envenenamento com sapos em humanos também são reportados, como no caso ocorrido no Hawaii, onde uma criança morreu depois de comer um sapo morto pelo seu pai, encontrado em um canavial (PALUMBO; PERRY; READ, 1975).

Embora um grande número de anfíbios seja conhecido, poucos apresentam perigo aos humanos (KLAASSEN, 2001). O envenenamento através do contato com o animal é raro, exceto quando o próprio animal ou sua secreção é ingerido, pois a manifestação de intoxicação surge através do contato com feridas ou mucosas do agressor (boca e olhos). Daly et al. (1987) relatam que a segunda geração de anfíbios nascidos em cativeiros perde sua capacidade de produzir toxinas e os animais tornam-se totalmente não-tóxicos, pois todas as toxinas são produzidas através de precursores encontrados na dieta do animal, explicando a diversidade da intoxicação por sapos nas mais variadas regiões.

De acordo com Daly (1995), várias proteínas hemolíticas de anfíbios são certamente de origem endógena. Assis, Barbosa e Carvalho (1985), verificaram que o veneno de *Bufo marinus paracnemis* possui compostos capazes de interferir com o sistema complemento

(SC). Marongio (2006), em estudos realizados com sapos *Rhinella schneideri* demonstrou a presença de um componente ativo sobre a via clássica do sistema complemento ainda não bem caracterizado.

1.1. SISTEMA COMPLEMENTO

De acordo com Walport (2001a), o sistema complemento (SC) é altamente sofisticado e regulado, exercendo um papel fundamental na defesa do organismo, como parte do sistema imune inato ou adaptativo. Este sistema é formado, basicamente, por várias proteínas séricas e de membrana, que são encontradas, em sua maioria, na forma inativa ou como pró-enzimas, cuja ativação resulta em diversas reações como lise de microrganismos e células infectadas, opsonização, solubilização e depuração de imunocomplexos, participação no processo de inflamação, entre outros (JANEWAY et al., 2000). A ativação deste sistema (Fig. 4) pode ser realizada por três diferentes vias:

- Via Clássica cujos componentes específicos são: complexo C1, composto por C1q, duas unidades de C1r e duas unidades de C1s; e os componentes C4 e C2;
- Via Alternativa: fator D e fator B;
- Via da Lectina: lectina ligante de manose (MBL), MASP-1, MASP-2, MASP-3, Map19, C4 e C2.

Figura 4. Sistema complemento e seus componentes específicos (adaptado de ABBAS et al.; 2006).

Os componentes do complexo de ataque à membrana (MAC, do inglês *membrane attack complex*) C5, C6, C7, C8 e C9, além do componente central das três vias de ativação (C3), são comuns a estas vias (Fig. 5).

As vias de ativação do complemento levam à geração das C3 convertases e, posteriormente, de C5 convertase, iniciando a via terminal e a formação do complexo de ataque à membrana (MAC). A formação desse complexo, inserido na membrana alvo, leva à ruptura e a lise celular (JANEWAY et al., 2000).

Figura 5. Etapas tardias da ativação do complemento e formação do MAC (adaptado de ABBAS et al.; 2006).

Na literatura foram identificados inibidores de proteases na pele de algumas espécies de anuros: *Bombina máxima* (LAI et al., 2002), *Bombina bombina* (MIGNOGNA, et al., 1996), *Bombina orientalis* e *Bombina variegata* (CHEN; SHAW, 2003), inibidor de tripsina isolado de *Dyscophus guinetii* (COLON; KIM, 2000), sugerindo que um possível inibidor de protease esteja presente no veneno de *Bufo paracnemis*. Zhao et al. (2005b) têm isolado e caracterizado inibidores de proteases da pele de sapos bufonoides.

1.2. PROTEASES

Proteases são enzimas que participam de diversos processos biológicos, tais como coagulação sanguínea, liberação de peptídeos biologicamente ativos (JACKSON; NEMERSON, 1980), fibrinólise (GUNTHER et al., 1989), cascata do complemento (PERKINS; SMITH, 1993), apoptose, processamento de proteínas após sua síntese (TILLOTSON et al., 1998), sendo também consideradas importantes fatores no desenvolvimento de inúmeras doenças humanas.

De acordo com o comitê de nomenclatura da União Internacional de Bioquímica e Biologia Molecular, as proteases são classificadas em dois grupos principais: as exopeptidases

e endopeptidases, dependendo do sítio de ação dessas enzimas na proteína. O processo de degradação das exopeptidases inicia a partir das extremidades amino (N) ou carboxiterminal (C) das proteínas, resultando em pequenos peptídeos ou aminoácidos. Já as endopeptidases clivam a proteína alvo na sua parte interna, longe das extremidades, resultando, assim, em peptídeos maiores. As proteases são também classificadas, de acordo com o tipo do grupo funcional presente no sítio catalítico da enzima, em outros quatro grupos importantes, que são: serina, cisteína, aspártico e metalo proteases (HARTLEY, 1960). Baseado no sítio de clivagem na região (N) ou (C) da proteína, as exopeptidases subdividem-se como aminopeptidases e carboxipeptidases (Tab. 1). As aminopeptidases agem na região (N) da cadeia peptídica, podendo liberar um único aminoácido, um dipeptídeo ou um tripeptídeo e as carboxipeptidases agem na região (C), podendo liberar um único aminoácido ou um dipeptídeo. As carboxipeptidases ainda podem ser classificadas em três grupos principais: serina, cisteína e metalo-carboxipeptidases, de acordo com a natureza dos resíduos de aminoácidos no sítio catalítico da enzima (WATSON, 1976; LABBE; REBEGROTTE; TURPINE, 1974).

As endopeptidases apresentam ação preferencial nas regiões internas das cadeias peptídicas e são divididas em quatro subgrupos: serino protease, aspártico protease, cisteína protease e metalo-protease (Tab. 2) (RAWLINGS; BARRET, 1993).

Tabela 2. Classificação e modo de ação das principais proteases.

<i>Protease</i>	<i>Modo de ação *</i>	<i>EC n°</i>
EXOPEPTIDASES		
❖ Aminopeptidase		3.4.14
Dipeptidil peptidase		3.4.14
Tripeptidil peptidase		3.4.16.3.4.18
❖ Carboxipeptidase		3.4.16.3.4.18
Serino protease		3.4.16
Metalo protease		3.4.17
Cisteína protease		3.4.18
Peptidil dipeptidase		3.4.15
Dipeptidase		3.4.13
ENDOPEPTIDASES		
Serino protease		3.4.21.3.4.34
		3.4.21
Cisteína protease		3.4.22
Aspártico protease		3.4.23
Metalo protease		3.4.24
		3.4.24

* Os círculos pretos indicam os aminoácidos terminais. As setas indicam os sítios de ação das proteases (adaptado de RAO et al., 1998).

Existem diversas proteases que não se enquadram nesse padrão de classificação, como exemplo, as proteases ATP – dependentes que necessitam de ATP para a sua atividade (MENON; GOLDBERG, 1987). Com base na sequência de aminoácidos, as proteases são

ainda classificadas em famílias diferentes e também em “clãs” para comportar os grupos de peptidases que evoluíram de um antepassado comum (RAWLINGS; BARRET, 1993).

O sistema complemento contém nove serino proteases, incluindo a MASP3, a mais nova serino protease descrita (SIM; LAICH, 2000). Cada protease pode ser considerada como uma molécula individual, cada qual com uma atividade mensurável como, por exemplo, proteolítica, estereolítica e aminolítica. Entre as proteases descritas estão C1r, C1s, MASP1, MASP2, MASP3, C2, Fator B, Fator D e Fator 1. Todas as proteases descritas requerem uma pré-ativação por outra protease, exceto o Fator 1 e o Fator D.

Considerando que o veneno de *Rhinella schneideri* apresenta ação sobre o sistema complemento, este trabalho visa isolar e caracterizar o componente do mesmo responsável por esta atividade. As atividades proteolíticas ou de inibição de proteases serão avaliadas, visto que a cascata de ativação do sistema complemento envolve várias serino proteases.

CONCLUSÕES

5. CONCLUSÕES

- Todo o processo de purificação do(s) possível (eis) componente (s) com atividade sobre o sistema complemento mostrou-se eficiente.
- Foi possível a verificação de bandas protéicas em gel de poliacrilamida com SDS da fração C1 (fração ativa) e do veneno bruto, confirmando, a presença de inúmeros componentes de alto e baixo peso molecular nos mesmos. A fração ativa (C1) apresenta, principalmente, compostos de alto peso molecular.
- Todas as subfrações (S1, S2, S3, S4 e S5), submetidas ao ensaio de atividade hemolítica sobre a via clássica/lectinas, apresentaram significativas reduções, destacando as subfrações S2 e S5.
- No ensaio de quimiotaxia, houve um aumento da migração celular induzida pela pré-incubação das subfrações S2 e S5 com soro humano normal (SHN), indicando que as mesmas são capazes de induzir a ativação do sistema complemento e, subsequente clivagem de C3 e C5, originando potentes fatores quimiotáticos (C3a e, principalmente, C5a).
- Na imunoeletroforese bidimensional, as subfrações S2 e S5 ativaram o sistema complemento, levando à clivagem de C3.
- A subfração S2, no ensaio de avaliação da capacidade geradora de SC5b-9, foi responsável pela maior formação do complexo (SC5b-9).
- As subfrações S2 e S5, nas concentrações utilizadas, não mostraram atividade proteolítica ou inibitória de protease.
- Foi possível o sequenciamento N-terminal dos 15 primeiros aminoácidos da banda protéica majoritária do gel de poliacrilamida. No sequenciamento N-terminal das subfrações S2 e S5, foi possível a identificação de 10 e 5 primeiros aminoácidos, respectivamente. No entanto, os resultados obtidos dos sequenciamentos apresentaram baixa confiabilidade, devido à baixa quantidade de material utilizada.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS¹

ABBAS, A. K., LICHTMAN, A. H.; POBER, J. S. **Cellular and Molecular Immunology**. 6th edition. Elsevier Science, 2006.

ALPER, C. A. **Snakes and the complement system**. In: Lee, C. Y. (ed). Snake venoms. Handbook Experimental Pharmacology. New York, Springer, v. 52, p. 863-80, 1979.

ASSIS, A. I. de; BARBOSA, J. E.; CARVALHO, I. F. Anticomplementary fraction from the poisonous secretion of paratoid gland of the toad (*Bufo marinus paracnemis* Lutz). **Experientia**, Basel, v. 41, n.7, p. 940-942, 1985.

BREDFORD, P. G. C. Toad venom toxicity and its clinical occurrence in small animals in the United Kingdom. **The Veterinary Record**, London, v. 94, n. 26, p. 613-614, 1974.

BERTAZZI, D. T.; ASSIS-PANDOCHI, A. I.; AZZOLINI, A. E.; TALHAFFERRO, V. L.; LAZZARINI, M.; ARANTES, E. C. Effect of *Tityus serrulatus* scorpion venom and its major toxin, TsTX-I, on the complement system *in vivo*. **Toxicon**, Oxford, v. 41, n.4, p. 501-8, 2003.

CHEN, T.; RAEL, E. D. Purification of M5, a fibrinolytic proteinase from *Crotalus molossus molossus* venom that attacks complement. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, London, v. 267, n. 18, p. 12736-41, 1992.

CHEN, T.; SHAW, C. Identification and molecular cloning of novel trypsin inhibitor analogs from de dermal venom of the oriental fire-bellied toad. (*Bombina orientalis*) and the European yellow-bellied toad (*Bombina variegata*). **Peptides**, New York, v. 24, n. 6, p. 873-880, 2003.

CHI, H. T.; HUNG M. D. Z.; HU, W. H.; YANG, D. Y. Prognostic implications of hyperkalemia in toad toxin intoxication. **Human & Experimental Toxicology**, Basingstoke, v. 17, n. 6, p. 343-346, 1998.

¹ Normatizado de acordo com ASSOCIAÇÃO BRASILEIRA DE NORMAS TÉCNICAS. *NBR 10520*: informação e documentação: apresentação de citações em documentos. Rio de Janeiro, 2002.

CLARK, D. P.; DURELL, S.; MALORY, W. L.; ZASLOFF, M. Ranalexin. A novel antimicrobial peptide from bull frog (*Rana catesbiana*) skin, structurally related to the bacterial antibiotic polymyxin. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 269, n. 14, p. 10849-10855, 1994.

CLARKE, M. H. G.; FREEMAN, T. Quantitative immunoelectrophoresis of human serum proteins. **Clinical Science**, London, v. 35, n.2, p. 403, 1968.

CLARKE, B. T. The natural history of amphibian skin secretions, their normal functioning and potential medical applications. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, London, v. 72, n. 3, p. 365-379, 1997.

COLON, J. M.; KIM, J. B. A protease inhibitor of the Kunitz family from skin secretions of tomato frog *Dyscophus guineti* (Microhylidae). **Biochemical and biophysical research communications**, New York, v. 279, n. 3, p. 961-964, 2000.

DALY, J. W.; MYERS, C. W.; WHITTAKER, N. Further classification of skin alkaloids from neotropical poison frogs (Dendrobatidae), with a general survey of toxic/noxious substances in the amphibia. **Toxicon**, Oxford, v. 25, n. 10, p. 1023-1095, 1987.

DALY, J. W. The chemistry of poisons in amphibian skin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, Washington, v. 92, n. 1, p. 9-13, 1995.

DIAS da SILVA, W. D.; TAMBOURGI, D. V.; CAMPOS, A. C. M. R.; MAGNOLI, F.; PETRICEVICH, V. L.; KIPNIS, T. L. Complement activation by animal venoms. **Journal of Toxicology Toxin Reviews**, New York, v. 14, n. 3, p. 375-400, 1995.

DEPPISCH, R.; SCHMITT, V.; BOMMER, J.; HÄNSCH, G. M.; RITZ, E.; RAUTERBERG, E. W. Fluid phase generation of terminal complement complex as a novel index of bioincompatibility. **Kidney International**, New York, v. 37, n.2, p. 696-706, 1990.

EGGERTSEN, G.; LIND, P.; SJOQUIST, J. Molecular characterization of the complement activating protein in the venom of the Indian cobra (*Naja n. siamensis*). **Molecular Immunology**, Oxford, v. 18, n. 2, p. 125-33, 1981.

EGGERTSEN, G.; LIND, P.; SJOQUIST, J. In vitro studies on complement inactivation by snake venoms. **Toxicon**, Oxford, v. 18, n.1, p. 87-95, 1980.

FARSKY, S. H.; WALBER, J.; COSTA-CRUZ, M.; CURY, Y.; TEIXEIRA, C. F. Leukocyte response induced by *Bothrops jararaca* crude venom: *in vivo* and *in vitro* studies. **Toxicon**, Oxford, v. 35, n. 2, p. 185-93, 1997.

FLEURY, Y.; VOUILLE, V.; BEVEN, L.; AMICHE, M.; WRÓBLEWSKI, H.; DELFOUR, A.; NICOLAS, P. Synthesis, antimicrobial activity and gene structure of a novel member of the dermaseptin B family. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, Amsterdam, v. 1396, n. 2, p. 228-236, 1998.

FROST, D. R. **Amphibian Species of the World: an online reference**. Version 5.3. Eletronic database. Disponível: <<http://research.amnh.org/herpetology/amphibia/index.php>>. American Museum of Natural History, New York, USA. Acesso em: 20 agosto. 2009.

GARD, A. D.; HIPPARGI, R.; GANDHARE, A. N. Toad skin-secretions: Potent source of pharmacologically and therapeutically significant compounds. **The Internet Journal of Pharmacology**, Sugar Land, v. 5, n. 2, 2008.

GUNTHER, L. A. M.; LEVIN, M. F. E. G.; SCANU, A. M.; PLOW, E. F. A potential basis for the thrombotic risks associated with lipoprotein(a). **Nature**, London, v. 339, n. 6222, p. 301-303, 1989.

GUTIERREZ, J. M.; ROMERO, M.; DIAZ, C.; BORKOW, G.; OVADIA, M. Isolation and characterization of a metalloproteinase with weak hemorrhagic activity from venom of the snake *Bothrops asper* (terciopelo). **Toxicon**, Oxford, v. 33, n. 1, p. 19-29, 1995.

HARRISON e LACHMANN. **Complement Technology**. Chapter. In: Weir, D. M. (ed). Handbook of Experimental Immunology. 4th Ed. Blackwell Scientific publications, v.1, p.39.1-39.49, 1986.

HARTLEY, B. S. Proteolytic enzymes. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 29, p. 45-72, 1960.

HOFMANN, L. G.; MAYER, M. M. **Immune hemolysis and complement fixation**. In: Willians, C. A.; Chase, M. W. Methods in Immunology and Immunochemistry. New York, Academic Press, v. 1, n. p. 140, 1997.

HUTCHINSON, D. A.; SAVITZKY, A. H. Vasculature of the parotoid glands of four species of toads (Bufonidae : Bufo). **Journal of Morphology**, Philadelphia, v. 260, n. 2, p. 247-254, 2004.

JACKSON, C. M.; NEMERSON, Y. Blood Coagulation. **Annual Review of Biochemistry**, Palo Alto, v. 49, p. 765-811, 1980.

JANEWAY, C. A.; TRAVERS, P.; WALPORT, M.; CAPRA, J. D. **Imunologia o sistema imunológico na saúde e na doença**. 4 ed. Porto Alegre: Artmed editora, 2000. Cap. 9, p. 339-357.

JARED, C.; ANTONIAZZI, M. M.; JORDÃO, A. E.; SILVA, J. R.; GREVEN, H.; RODRIGUES, M. T. Parotoid macroglands in toad (*Rhinella jimi*): their structure and functioning in passive defence. **Toxicon**, Oxford, v. 54, n. 3, p. 197-207, 2009.

KLAASSEN, C. D. Casarett and Doull's. **The basic science of poisons**. 6th Ed. Editora McGraw-Hill Companies, 2001.

KOCK, M. A.; HEW, B. E.; BAMMERT, H.; FRITZINGER, D. C.; VOGEL, CARL-WILHELM. Structure and function of recombinant cobra venom factor. **The Journal of Biological Chemistry**, Bethesda, v. 279, n. 29, p. 30836-30843, 2004.

LABBE, J. P.; REBEGROTTE, P.; TURPINE, M. Demonstrating extra-cellular leucine aminopeptidase (ER 3.4.1.1) of *Aspergillus oryzae* (IP 410): leucine aminopeptidase 2 fraction. **Comptes Rendus de l'Académie des Sciences**, Paris, v. 278, n. 2699, 1974.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural protein during the assembly of the head of bacteriophage "T4". **Nature**, London, v. 227, n. 5257, p. 680-685, 1970.

LAI, R.; ZHAO, Y.; YANG, D.; ZHA, H.; LEE, W.; ZHANG, Y.; Comparative study of the biological activities of the skin secretions from six common Chinese amphibians. **Zoological Research**, Kunming, v. 23, n. 2, p. 113-119, 2002.

LAI, R.; LIU, H.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Identification and cloning of a trypsin inhibitor from skin secretions of Chinese red-belly toad *Bombina maxima*. **Comparative biochemistry and physiology. Part B, Biochemistry & Molecular Biology**. Oxford, v. 131, n.1, p. 47-43, 2003.

MAN, D. P.; MINTA, J. O. Purification, characterization and analysis of the mechanism of action of four anti-complementary factors in *Crotalus atrox* venom. **Immunochemistry**, Oxford, v. 14, n. 7, p. 521-7, 1977.

MARONGIO, A. F. Q. **Isolamento e caracterização parcial do componente de *Bufo paracnemis* com ação sobre o sistema complemento. Estudos *in vitro* e atividade proteolítica**. 2006. 92f. Dissertação (Mestrado em Toxicologia) – Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto, Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2006.

MENON, A. S.; GOLDBERG, A. L. Protein substrates activate the ATP-dependent protease La by promoting nucleotide binding and release of bound ADP. **Journal Biological Chemistry**, Baltimore, v. 262, n. 31, p. 14929-14934, 1987.

MIGNOGNA, G.; SIMMACO, M.; KREIL, G.; BARRA, D. Antibacterial and haemolytic peptides containing D-alloisoleucine from the skin of *Bombina variegata*. **EMBO Journal**, Oxford, v. 12, n. 12, p. 4829-32, 1993.

MIGNOGNA, G.; PASCARELLA, S.; WECHSELBERGER, C.; HINTERLEITNER, C.; MOLLAY, C.; AMICONI, G; BARRA, D.; KREIL, G. BSTI, a trypsin inhibitor from skin secretions of *Bombina bombina* related to protease inhibitors of nematodes. **Protein Science**, New York, v. 5, n. 2, p. 357-362, 1996.

MONTI, R.; CARDELLO, L. **Bioquímica dos Venenos de Anfíbios**. In: BARRAVIERA, B. (ed.) Venenos animais – uma visão integrada. Rio de Janeiro, EPUC, 1994. p. 225-232.

MÜLLER-EBERHARD, H. J.; FJELLSTROM, K. E. Isolation of the anticomplementary protein from cobra venom and its mode of action on C3. **Journal of Immunological Methods**, Baltimore, v. 107, n. 6, p. 1666-72, 1971.

NICOLAS, P.; MOR, A. Peptides as weapons against microorganisms in the chemical defense of vertebrates. **Annual Review of Microbiology**, Palo Alto, v. 49, p. 277-304, 1995.

PALUMBO N. E.; PERRY, S. F.; READ, G. Experimental induction and treatment of toad poisoning in the dogs. **Journal of the American Veterinary Medical Association**, Chicago, v. 167, n. 11, p. 1000-5, 1975.

PERKINS, S. J.; SMITH, K. F. Identity of the putative serine-proteinase fold in proteins of the complement system with nine relevant crystal structures. **Biochemical Journal**, London, v. 295, n. 1, p. 109-114, 1993.

PERRY, D. Proteins of parotoid gland secretions from toads of the genus *Bufo*. **Contemporary Herpetology**, Louisiana, v. 2000, n. 3, 2000.

PETERSON, G. L. Determination of total protein. In: Methods in enzymology: enzyme structure, part I, (Hirs, C. H. W.; Timasheff, S. N. Eds) **Academic Press**, New York, v. 91, 1983.

PRATES, M. V.; BLOCH JR., C. Peptídeos antimicrobianos – Uma alternativa no combate a microorganismos resistentes. **Biotecnologia, Ciência e Desenvolvimento**, Brasília, v.17, p. 30-36, 2000.

RAO, M. B.; TANKSALE, A. M.; GHATGE, M. S.; DESHPANDE, V. V. Molecular and Biotechnological Aspects of Microbial Proteases. **Microbiology and Molecular Biology Reviews**, Washington, v. 62, n. 3, p. 597-635, 1998.

RAWLINGS, N. D.; BARRET, A. J. Evolutionary families of peptidases. **The Biochemical Journal**, Auckland, v. 290, n. 1, p. 205-218, 1993.

SAKATE, M.; LUCAS DE OLIVEIRA, P. C. Toad envenoming in dogs: effects and treatment. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, Botucatu, v. 6, n. 1, 2000.

SHARMA, S.; JABEEN, T.; SINGH, R. K.; BREDEHORST, R.; VOGEL, C. W.; BETZEL, C.; SINGH, T. P. Structural studies on the cobra venom factor: isolation, purification, crystallization and preliminary crystallographic analysis. **Acta Crystallographica Section D: Biological Crystallography**, Copenhagen, v. 57, n. 4, p. 596-8, 2001.

SIM, R. B.; LAICH, A. Serine proteases of the complement system. **Biochemical Society Transactions**, U.K., v. 28, n. 5, p. 545-550, 2000.

TAMBOURGI, D. V.; Dos SANTOS, M. C.; FURTADO, M. F.; De FREITAS, M. C; Da SILVA, W. D.; KIPNIS, T. L. Pro-inflammatory activities in elapid snake venoms. **British Journal of Pharmacology**, London, v. 112, n. 3, p. 723-7, 1994.

TAMBOURGI, D. V.; MAGNOLI, F. C.; VON EICKTGEDT, V. R. D.; BENEDETTI, Z. C.; PETRICEVICH, V. L.; Da SILVA, W. D. Incorporation of a 35-kilodalton purified protein from *Loxosceles intermedia* spider venom transforms human erythrocytes into activators of autologous complement alternative pathway. **Journal of immunology**, Baltimore, v. 155, n. 9, p. 4459-66, 1995.

TILLOTSON, R. D.; WÖSTEN, H. A. B.; RICHTER, M.; WILLEY, J. M. A surface active protein involved in aerial hyphae formation in the filamentous fungus *Schizophyllum commune* restores the capacity of a bald mutant of the filamentous bacterium *Streptomyces coelicolor* to erect aerial structures. **Molecular Microbiology**, Oxford, v. 30, n. 3, p. 595-602, 1998.

TOLEDO, R. C; JARED, C.; Review: Cutaneous granular glands and amphibian venoms. **Comparative Biochemistry and Physiology**, New York, v. 111A, n. 1, p. 1-29, 1996.

VITAL BRAZIL; VELLARD, J. **Contribuição ao estudo dos batrachios**. Memórias do Instituto Butantan, São Paulo, 1926. v. 3, 7-70p.

WALPORT, M. J. Complement. First of two parts. **The New England Journal of Medicine**, Waltham v. 344, n. 14, p. 1058-66, 2001a.

WATSON, R. R. Substrate specificities of aminopeptidases: a specific method for microbial differentiation. **Methods in Microbiology**, v. 9, p. 1-14, 1976.

WEIL, A.T.; DAVIS, W; *Bufo alvarius*: a potent hallucinogen of animal origin. **Journal of Ethnopharmacology**, Limerick, v. 41, n. 1-2, p. 1-8, 1994.

ZHAO, Y.; JIN, Y.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Isolation and preliminary characterization of a 22-kDa protein with trypsin inhibitory activity from toad *Bufo andrewsi* skin. **Toxicon**. Oxford, v. 46, n. 3, p. 277–281, 2005a.

ZHAO, Y.; JIN, Y.; WEI, S. S.; LEE, W.H., ZHANG, Y. Purification and characterization of a irreversible serine protease inhibitor from skin secretions of *Bufo andrewsi*. **Toxicon**. Oxford, v. 46, n. 6, p. 635-640, 2005b.

ZIGMOND, S. H.; HIRSH, J .G. Leukocyte locomotion and chemotaxis. New methods for evaluation and demonstration of a cell-derived chemotactic factor. **Journal of Experimental Medicine**, New York, v. 137, n. 2, p. 387-410, 1973.

ZOMOT, E.; BENDAHAN, A.; QUICK, M.; ZHAO, Y.; JAVITCH, J. A.; KANNER, B. I. "Mechanism of chloride interaction with neurotransmitter:sodium symporters". **Nature**. London, v. 449, n. 7163, p. 726–30, 2007.