

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ISADORA SOUSA DE OLIVEIRA

**Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da
peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

Ribeirão Preto

2021

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE CIÊNCIAS FARMACÊUTICAS DE RIBEIRÃO PRETO

ISADORA SOUSA DE OLIVEIRA

**Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da
peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP para obtenção do Título de Doutor em Ciências
Área de Concentração: Toxicologia.

Orientadora: Profa. Dra. Eliane Candiani Arantes Braga

Co-orientadora: Profa. Dra. Manuela Berto Pucca

Versão corrigida da Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Toxicologia no dia 18/06/2021. A versão original encontra-se disponível na Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto/USP.

Ribeirão Preto
2021

RESUMO

OLIVEIRA, I. S. **Avaliação bioquímica, estrutural e funcional de uma fosfodiesterase da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***. 2021. 106f. Tese (Doutorado). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Peçonhas ofídicas apresentam alta complexidade de componentes e, para a elucidação de seus mecanismos de toxicidade, é necessário que os mesmos sejam isolados e caracterizados, para que sua ação durante o envenenamento se torne esclarecida, facilitando o tratamento do respectivo sintoma. Muitos componentes minoritários da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus* ainda não foram estudados. A fosfodiesterase (PDE) já havia sido identificada na peçonha, mas não tinha sido isolada ou caracterizada. Enzimas da classe PDE são responsáveis pela quebra das ligações fosfodiéster de ácidos nucléicos, ATP, ADP, NAD, NGD, AMPc e GMPc, interferindo em processos fisiológicos ou patológicos, o que as tornam alvos terapêuticos de diversas patologias. Assim, os objetivos deste estudo foram o isolamento e a caracterização bioquímica, estrutural e funcional da PDE da peçonha de *C. d. collilineatus* (*CdcPDE*). O isolamento da *CdcPDE* foi realizado por combinação de técnicas de cromatografia líquida, como filtração molecular, trocas aniônica e catiônica, respectivamente, sendo seu rendimento <1%. Por SDS-PAGE, foi possível observar sua migração como um monômero e a presença de glicosilações na molécula. Por espectrometria de massas, a *CdcPDE* apresentou duas massas moleculares determinadas por MALDI-TOF, 100 e 105 kDa, e por LC-MS/MS em união com o sequenciamento amino-terminal, foi possível determinar uma sequência para a *CdcPDE*, formada por 829 resíduos de aminoácidos. Por análises *in silico*, foi possível estimar as suas estruturas secundária e terciária, bem como a sua interação com o substrato *bis(p-nitrofenil) fosfato*. Utilizando este mesmo substrato, a *CdcPDE* apresentou maior atividade enzimática entre os pH 8 e 8,5, a 37 °C, e a melhor temperatura para armazená-la foi 0 °C. Alguns agentes redutores e um quelante metálico inibiram a atividade enzimática de *CdcPDE*, sugerindo que as pontes dissulfeto em sua estrutura são essenciais para a atividade, bem como os íons metálicos, o que a caracteriza como uma metaloenzima. Os parâmetros cinéticos obtidos foram: $K_m = 0,38 \text{ mM}$, $V_{m\acute{a}x} = 0,7 \text{ }\mu\text{M/s}$, $k_{cat} = 0,14 \text{ s}^{-1}$ e sua eficiência catalítica foi igual a $0,37 \text{ mM}\cdot\text{s}^{-1}$, mostrando alta afinidade pelo substrato utilizado, bem como, eficiência cinética, quando comparada a outras PDE oriundas de peçonhas ofídicas. Outros ensaios demonstraram que a *CdcPDE* reduz/perde atividade enzimática com a perda de água e em contato com TFA, e sua temperatura de desenovelamento foi de 65,71 °C. Por ELISA, foi possível observar que o soro anticrotálico produzido pelo Instituto Butantan reconhece a *CdcPDE* e, por análise *in silico*, foram identificados 16 possíveis epítomos imunogênicos na molécula. Por fim, foi possível observar que a *CdcPDE* inibe a agregação de plaquetas induzidas por ADP e é uma molécula citotóxica para queratinócitos humanos, apresentando valor de IC_{50} de 71,65 $\mu\text{g/mL}$. Esta ação nunca foi relatada para PDE de peçonhas ofídicas, sugerindo também, a possibilidade de efeitos locais destas moléculas durante o envenenamento. Assim, estas enzimas podem ser importantes ferramentas moleculares para a pesquisa, bem como, para a terapêutica, visto que apresentam funções bioquímicas capazes de interferir tanto com processos fisiológicos quanto patológicos.

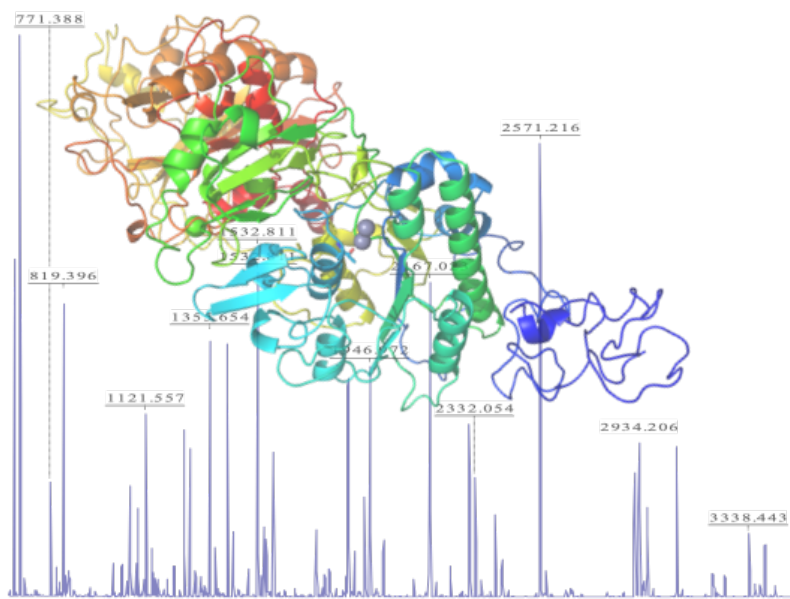
Palavras-chave: *Crotalus durissus collilineatus*, peçonha de serpente, nuclease, fosfodiesterase, agregação plaquetária, citotoxicidade.

ABSTRACT

OLIVEIRA, I. S. **Biochemical, structural and functional evaluation of a phosphodiesterase from *Crotalus durissus collilineatus* venom.** 2021. 106p. Thesis (Doctoral). Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto – Universidade de São Paulo, Ribeirão Preto, 2021.

Snake venoms present a high complexity of components and, in order to elucidate their toxicity mechanisms, it is necessary that they are isolated and characterized, so that their action during envenoming becomes clarified, facilitating the respective symptom treatment. Many minority components from *Crotalus durissus collilineatus* venom have not yet been studied. Phosphodiesterase (PDE) had already been identified in the venom, but had not been isolated or characterized. PDE enzymes class are responsible for breaking phosphodiester bonds of nucleic acids, ATP, ADP, NAD, NGD, cAMP and cGMP, interfering in physiological or pathological processes, which make them therapeutic targets for various pathologies. Thus, the objectives of this study were the isolation and biochemical, structural and functional characterization of the PDE from *C. d. collilineatus* venom (*CdcPDE*). The *CdcPDE* isolation was performed by combining liquid chromatography techniques, such as molecular filtration, anion and cation exchanges, respectively, with a yield <1%. Through SDS-PAGE, it was possible to observe its migration as a monomer and the presence of glycosylations in the molecule. By mass spectrometry, *CdcPDE* showed two molecular masses determined by MALDI-TOF, 100 and 105 kDa, and by LC-MS/MS in union with the amino-terminal sequencing, it was possible to determine *CdcPDE* sequence, consisting by 829 amino acid residues. By *in silico* analysis, it was possible to estimate their secondary and tertiary structures, as well as their interaction with the *bis(p-nitrophenyl)* phosphate substrate. Using this same substrate, *CdcPDE* showed greater enzymatic activity between pH 8 and 8.5, at 37 °C, and the best temperature to store was 0 °C. Some reducing agents and a metal chelator inhibited the *CdcPDE* enzymatic activity, suggesting that the disulfide bridges in its structure are essential for the activity, as well as metal ions, which characterizes it as a metalloenzyme. Obtained kinetic parameters are: $K_m = 0.38$ mM, $V_{max} = 0.7$ μ M/s, $k_{cat} = 0.14$ s⁻¹ and its catalytic efficiency was equal to 0.37 mM.s⁻¹, showing high affinity by the substrate used, as well as, kinetic efficiency, when compared to others snake venom PDE. Other assays demonstrated that *CdcPDE* reduces/loses enzymatic activity with water loss and in contact with TFA, and its unfolding temperature was 65.71 °C. By ELISA, it was possible to observe that the anticrotalid serum produced by Instituto Butantan recognizes *CdcPDE* and, by *in silico* analysis, 16 possible immunogenic epitopes on the molecule were identified. Finally, it was possible to observe that *CdcPDE* inhibits platelet aggregation ADP-induced and it is a cytotoxic molecule for human keratinocytes, presenting an IC₅₀ value of 71.65 μ g/mL, and this action has never been reported for snake venoms PDE, also suggesting the possibility of local effects of these molecules during the envenoming. Thus, these enzymes can be important molecular tools for research, as well as, for therapy, since they have biochemical functions capable of interfering with both physiological and pathological processes.

Keywords: *Crotalus durissus collilineatus*, snake venom, nuclease, phosphodiesterase, platelet aggregation, cytotoxicity.



1. Introdução

1.1. Serpentes no mundo e no Brasil

Capazes de habitar todos os continentes do planeta, exceto a Antártida, as serpentes representam um grupo de vertebrados que obteve um grande sucesso evolutivo (MARQUES; MEDEIROS, 2018).

Existem mais de 11 mil espécies de répteis, incluindo 3.789 espécies de serpentes reconhecidas globalmente. Entre estas serpentes podemos citar as superfamílias Acrochordoidea, Booidea, Colubroidea, Elapoidea, Pythonoidea, Typhlopoidea, Uropeltoidea, e as famílias que não se enquadram a nenhuma destas superfamílias, Aniliidae, Bolyeriidae, Homalopsidae, Pareidae, Tropidophiidae, Viperidae, Xenodermidae e Xenophidiidae (UETZ, 2020).

Incluídas na família Viperidae podemos encontrar as víboras asiáticas e do velho mundo, além de cascavéis americanas (WARRELL, 2012). Serpentes pertencentes a esta família, possuem cabeça triangular, que é recoberta de escamas semelhantes às outras escamas de seu corpo (MELGAREJO, 2003). Esta família apresenta três subfamílias, Viperinae, Azemiopinae e Crotalinae, sendo esta última caracterizada por apresentar a chamada fosseta loreal, órgão capaz de detectar presas endotérmicas e suas direções, pois é um órgão termorreceptor, escamas dorsais carenadas e pupilas verticais (BULLOCK; COWLES, 1952; CAMPBELL; LAMAR, 2004; BAKKEN; KROCHMAL, 2007; UETZ, 2020).

Atualmente, o Brasil concentra 795 espécies de répteis, entre estas, 405 são espécies de serpentes, e apenas uma espécie de serpente do gênero *Crotalus* é distribuída por todo o território nacional, a espécie *Crotalus durissus*, popularmente conhecida como cascavel, pertencente a subfamília Crotalinae (COSTA; BÉRNILS, 2018; UETZ, 2020). Embora exista apenas uma espécie, existem seis subespécies de *C. durissus* em diferentes regiões do país (COSTA; BÉRNILS, 2018):

- *C. d. cascavella*: Maranhão, Piauí, Ceará, Rio Grande do Norte, Paraíba, Pernambuco, Alagoas, Sergipe, Bahia e Minas Gerais;
- *C. d. collilineatus (Cdc)*: Tocantins, Mato Grosso, Mato Grosso do Sul, Goiás, Distrito Federal, Minas Gerais e São Paulo;
- *C. d. durissus*: Amapá;
- *C. d. marajoensis*: Pará;
- *C. d. ruruima*: Roraima;



- *C. d. terrificus*: Tocantins, Mato Grosso, Minas Gerais, Rio de Janeiro, São Paulo, Paraná, Santa Catarina e Rio Grande do Sul.

O gênero *Crotalus* tem seu nome derivado da palavra grega “*Krotalon*”, que significa “castanhola” ou “chocalho”, o que se refere ao final da cauda destas serpentes que apresentam um apêndice, que produz ruído semelhante a um chocalho quando o animal está irritado ou prestes a atacar presas (MELGAREJO, 2003; CAMPBELL; LAMAR, 2004). Este apêndice diferencia as cascavéis de outros gêneros de serpentes, como o gênero *Lachesis*, que possui as últimas escamas subcaudais eriçadas e modificadas, terminando num espinho, e o gênero *Bothrops*, que não possui modificações em sua cauda simples (MELGAREJO, 2003).

A figura 1 apresenta um exemplar da serpente *C. d. collilineatus*.



Figura 1. Serpente da família Viperidae. Foto de um exemplar da subespécie *Crotalus durissus collilineatus* (Arquivo do Laboratório de Toxinas Animais – LTA).

Sendo classificados como predadores ativos, as cascavéis se alimentam de pássaros, lagartos e pequenos mamíferos (LEMA; ARAÚJO; AZEVEDO, 1983; MACARTNEY, 1989). Para esta alimentação, bem como durante o envenenamento, a peçonha é injetada na presa através de compressão das glândulas de peçonha, localizadas na região pós-orbital da cabeça destes animais, associadas ao aparelho inoculador do tipo solenóglifo, constituído por um dente



funcional grande, agudo e oco (MELGAREJO, 2003; JACKSON, 2007; FRY et al., 2008; VONK et al., 2008).

1.2. Envenenamentos por serpentes no Brasil e tratamento

Mundialmente são registrados em média 5,4 milhões de acidentes ofídicos por ano, os quais levam em torno de 2,7 milhões de casos de envenenamentos, 138 mil mortes e 400 mil vítimas adquirem sequelas decorrentes desta patologia ou se tornam deficientes (WHO, 2019; BOLON et al., 2020).

Entre os locais mais afetados estão países tropicais e subtropicais, localizados na África, Ásia e América Latina, sendo que apenas nesta última ocorrem entre 137 mil e 150 mil casos, acarretando em até 5 mil mortes por ano (GUTIÉRREZ et al., 2017; WHO, 2019). Devido a sua grande ocorrência, a Organização Mundial da Saúde (WHO, do inglês *World Health Organization*) adicionou novamente os acidentes ofídicos à lista de Doenças Tropicais Negligenciadas (DTN), com altíssima prioridade (categoria A) em 2019 (WHO, 2019).

Curiosamente, esta doença ocupacional apresenta semelhança epidemiológica com outras zoonoses, devido à transmissão de patógenos a humanos através de animais, mas, ao contrário destas, é difícil mapear, prever e reduzir riscos destes acidentes ofídicos, visto que ainda não é possível controlá-los, como ocorre com algumas zoonoses (MURRAY; MARTIN; IWAMURA, 2020).

Indivíduos que não têm acesso, ou pouco acesso, a sistemas de saúde e educação, são os mais acometidos pelos acidentes ofídicos. Estes fazem parte de camadas socioeconômicas mais inferiores, como pescadores, caçadores e agricultores, ou vivem em extrema pobreza, mas também estão incluídos indigentes e indígenas, os quais são frequentemente acidentados em florestas enquanto estão trabalhando ou, simplesmente, andando (PIERINI et al., 1996; HARRISON et al., 2009; HABIB et al., 2015; GUTIÉRREZ et al., 2017).

No Brasil, esta questão também é preocupante, visto que ocorreram mais de 25 mil casos de acidentes ofídicos por ano, conforme dados dos últimos cinco anos (Tab. 1). Os acidentes causados por serpentes do gênero *Bothrops* são os mais numerosos, seguidos pelos acidentes ocasionados por serpentes do gênero *Crotalus*, que embora em menor número, aproximadamente 10 vezes menor, apresenta maior letalidade, visto que a peçonha destes animais é considerada mais tóxica, de acordo com dados do Ministério da Saúde (BRAZIL,



1911; BELLUOMINI, 1984; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001, 2021; FERREIRA-JÚNIOR, 2003).

Tabela 1. Epidemiologia dos acidentes ofídicos ocasionados por serpentes do gênero *Crotalus* no Brasil.

Ano	Acidentes ofídicos	Acidentes crotálicos	Tipo de acidente crotálico			Óbitos
			Leve	Moderado	Grave	
2015	27.113	1.972	825	786	258	256
2016	26.561	2.182	936	824	292	280
2017*	28.752	2.506	1.139	875	353	307
2018*	28.857	2.555	1.113	962	356	303
2019*	30.482	2.610	1.193	1.020	279	413

Dados coletados do Departamento de Informática do Sistema Único de Saúde (DATASUS), do Ministério da Saúde do Brasil (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2021).

*Dados sujeitos a revisão.

Os acidentes crotálicos são caracterizados por sua ação neurotóxica, pois neurotoxinas presentes na peçonha são capazes de atingir o sistema nervoso central e periférico, causando paralisia, devido a inibição de neurotransmissor nas fendas sinápticas. Assim, entre os sinais do envenenamento crotálico estão parestesia de músculos faciais (face miastênica), ptose palpebral e paralisia gradual dos músculos respiratórios (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003; TOKARNIA et al., 2014).

Já as miotoxinas presentes nestas peçonhas causam lesões teciduais sistêmicas em músculos esqueléticos, desencadeando o processo de rabdomiólise, seguido por mioglobínúria, o que leva a coloração escurecida da urina da vítima do envenenamento crotálico. Por causa desta situação, lesões tubulares renais podem ocorrer, levando à insuficiência renal aguda (IRA); e o paciente pode apresentar oligúria ou anúria. A IRA e o choque cardiovascular são as principais causas de óbito de pacientes envenenados (WHO, 2007; TOKARNIA et al., 2014; MEDEIROS et al., 2020).

As vítimas de envenenamento crotálico apresentam dor difusa e em seus dados laboratoriais são observados aumentos significativos de aldolase, aspartato aminotransferase (AST), creatinoquinase (CK) e lactato desidrogenase (LDH) (AZEVEDO-MARQUES; CUPO; HERING, 2003). Ainda, esta peçonha possui ação semelhante à trombina, consumindo fibrinogênio, ocasionando a hipofibrinogenemia e, assim, o sangue se torna incoagulável (THOMAZINI; BARRAVIERA; BARRAVIERA, 1994; MINISTÉRIO DA SAÚDE, 1998; TOKARNIA et al., 2014).



Estes envenenamentos crotálicos podem ser considerados como leves, moderados e graves, de acordo com os sinais e sintomas apresentados pelas vítimas, variando entre ausentes e totalmente evidentes e intensos, e, a partir desta gravidade, a quantidade de ampolas de soro antiofídico a ser infundido no paciente é determinada (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2001). Este soro é constituído por imunoglobulinas obtidas a partir do sangue de animais hiperimunizados (cavalos) com peçonhas específicas (WHO, 2010). Este tratamento é essencial e tem sido utilizado há mais de um século, sendo introduzido em 1895, por Albert Calmette, na clínica dos envenenamentos. Posteriormente, a técnica de soroterapia heteróloga foi explorada e aprimorada no Brasil por Vital Brazil Mineiro da Campanha (LIRA-DA-SILVA et al., 2018). Além da terapia específica com o antiveneno, a terapia geral também necessita de outras técnicas de emergência, as quais são realizadas de acordo com outros fatores de risco, como problemas cardíacos e respiratórios (WARRELL, 2010).

1.3. Peçonhas crotálicas

Constituídas de diversos tipos de componentes, entre eles carboidratos, lipídeos e aminoácidos, as peçonhas crotálicas possuem majoritariamente proteínas (90% a 95%) (ARAÚJO et al., 2016), que podem ser divididas entre componentes não enzimáticos e enzimáticos (CALVETE; JUÁREZ; SANZ, 2007).

Nestas peçonhas destaca-se a ocorrência da proteína crotóxina, por ser o componente mais tóxico (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971) e mais abundante, correspondendo entre 65-68% da peçonha (DA SILVA; BIER, 1982). Na verdade, a crotóxina é um complexo de duas proteínas ou subunidades, a fosfolipase A₂ (PLA₂, subunidade básica) e a crotapotina (subunidade ácida), sendo esta última desprovida de atividade enzimática, porém capaz de inibir atividade enzimática da PLA₂, aumentando também a sua toxicidade (CHANG; SU, 1981; RADVANYI et al., 1989). Além da atividade miotóxica, esta PLA₂ possui ação neurotóxica por impedir que neurotransmissores sejam liberados na placa motora. Entretanto, a PLA₂ apenas realiza esta última ação quando está complexada com a crotapotina, a qual atua como uma chaperona, evitando ligações inespecíficas da PLA₂ e sua atividade na junção pré-sináptica (CHANG; SU, 1981; BON et al., 1989; CHOUMET et al., 1993; CLISSA, 1997).

Existem enzimas capazes de causar hemorragia, que são as metaloproteases (GUTIÉRREZ et al., 2016). As metaloproteases apresentam atividades fibrinolítica e fibrinogenolítica, ativam fator X e protrombina, podem inibir a agregação de plaquetas e ainda



induzem apoptose (FOX; SERRANO, 2005), tendo uma importante função na fisiopatologia dos envenenamentos (FOX; SERRANO, 2009).

Outra enzima presente na peçonha que atua no sistema hematológico é a serinoprotease, inferindo na coagulação sanguínea, agregação plaquetária e fibrinólise (SERRANO; MAROUN, 2005). Entre as serinoproteases estão as enzimas trombina-símile, que agem sobre proteínas plasmáticas, semelhante a ação da trombina, causando distúrbios hematológicos também (ALEXANDER et al., 1988; SERRANO; MAROUN, 2005). Neste grupo, também se destacam as gioxinas, capazes de causar lesões no labirinto de animais envenenados, induzindo-os a girar em torno de seus próprios eixos (BACILA, 1961; BARRABIN et al., 1978; SEKI; VIDAL; BARRIO, 1980).

Já entre componentes não-enzimáticos, pode ser encontrada a crotamina (GONÇALVES; VIEIRA, 1950), capaz de despolarizar células e agir de forma miotóxica (OGUIURA; BONI-MITAKE; RÁDIS-BAPTISTA, 2005). Esta miotoxina pode estar ou não presente na peçonha de cascavéis brasileiras, de forma que sua frequência aumenta de acordo com o eixo leste-oeste, bem como, norte-sul do Brasil, sendo que nos centros destes eixos, é possível encontrar ambas as peçonhas, crotamina-positiva e negativa (SCHENBERG, 1959; BOLDRINI-FRANÇA et al., 2010). Além disso, a crotamina pode atuar em canais iônicos para potássio, bloqueando-os, de forma que causa a extensão e paralisia de patas traseiras de camundongos (PEIGNEUR et al., 2012).

Além da crotamina, a convulxina também está presente em peçonhas crotálicas. Esta proteína é formada por duas subunidades, α e β , formando uma estrutura tetramérica (MARLAS, 1985), sendo um potente ativador da agregação plaquetária (VARGAFTIG et al., 1980; FRANCISCHETTI et al., 1997), porém desprovido de ação hemaglutinante (TOYAMA et al., 2001; ARLINGHAUS; EBLE, 2012).

Além destes componentes, também pode ser observada a ocorrência de outros componentes, mas em menores proporções, como hialuronidases (BORDON et al., 2012), L-aminoácido oxidases (DU; CLEMETSON, 2002), lectinas (OGAWA et al., 2005), desintegrinas (OLIVEIRA et al., 2018), peptídeos potencializadores de bradicinina (HIGUCHI et al., 2006), fatores de crescimento e nucleases (BOLDRINI-FRANÇA et al., 2017), sendo todos estes e os já citados passíveis a variações qualitativas e quantitativas, alterando assim a toxicidade e as manifestações clínicas do envenenamento (ARAÚJO et al., 2016; OLIVEIRA et al., 2019).



1.4. Fosfodiesterases em peçonhas ofídicas

Dentre as nucleases, enzimas capazes de realizar hidrólise de ácidos nucleicos e seus derivados, existem as endonucleases (DELEZENNE; MOREL, 1919), denominadas DNAses (TABORDA et al., 1952a) e RNAses (TABORDA et al., 1952b), responsáveis pela hidrólise de ácidos desoxirribonucleico (DNA) e ribonucleico (RNA), respectivamente, e exonucleases, representadas apenas pelas fosfodiesterases (PDE, do inglês *phosphodiesterases*) (UZAWA, 1932). As PDE são enzimas capazes de hidrolisar as ligações fosfodiéster de polinucleotídeos em pH básico, iniciando pela extremidade 3', liberando 5'-mononucleotídeos (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010).

Alguns parâmetros bioquímicos são levados em consideração para a diferenciação entre os dois grupos enzimáticos. Nucleases que apresentam pH ótimo mais ácido e não necessitam de cátions divalentes para sua atividade são consideradas endonucleases. Enquanto exonucleases são aquelas que apresentam pH ótimo básico e necessitam de íons metálicos divalentes para sua atividade (GEORGATSOS; LASKOWSKI, 1962; IWANAGA; SUZUKI, 1979; MACKESSY, 1998; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010).

Além da hidrólise de DNA e RNA, PDE hidrolisam também trifosfato de adenosina (ATP), difosfato de adenosina (ADP), dinucleotídeo de nicotinamida e adenina (NAD), dinucleotídeo de nicotinamida e guanina (NGD), monofosfato cíclico de adenosina (AMPc) e monofosfato cíclico de guanosina (GMPc), regulando estes segundos mensageiros (SEGOVIA; FIGUEROA, 2007; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010). Assim, estas enzimas são capazes de intervir em processos fisiológicos, como contração muscular, diferenciação celular, a função de canais iônicos, lipogênese, gliconeogênese, glicogenólise e apoptose (PERRY; HIGGS, 1998; JEON et al., 2005; PENG et al., 2011).

Esta família de enzimas pode ser dividida e classificada de 1 a 11, sendo PDE1 a PDE11, de acordo com a sensibilidade para inibidores, a sequência proteica, propriedades farmacológicas e a especificidade para o substrato, sendo que PDE 4, 7 e 8 são específicas para a degradação de AMPc, 5, 6 e 9 para GMPc e 1, 2, 3, 10 e 11 para a degradação de ambos os substratos (MEHATS et al., 2002; MASSIMI et al., 2017), como demonstrado na figura 2.



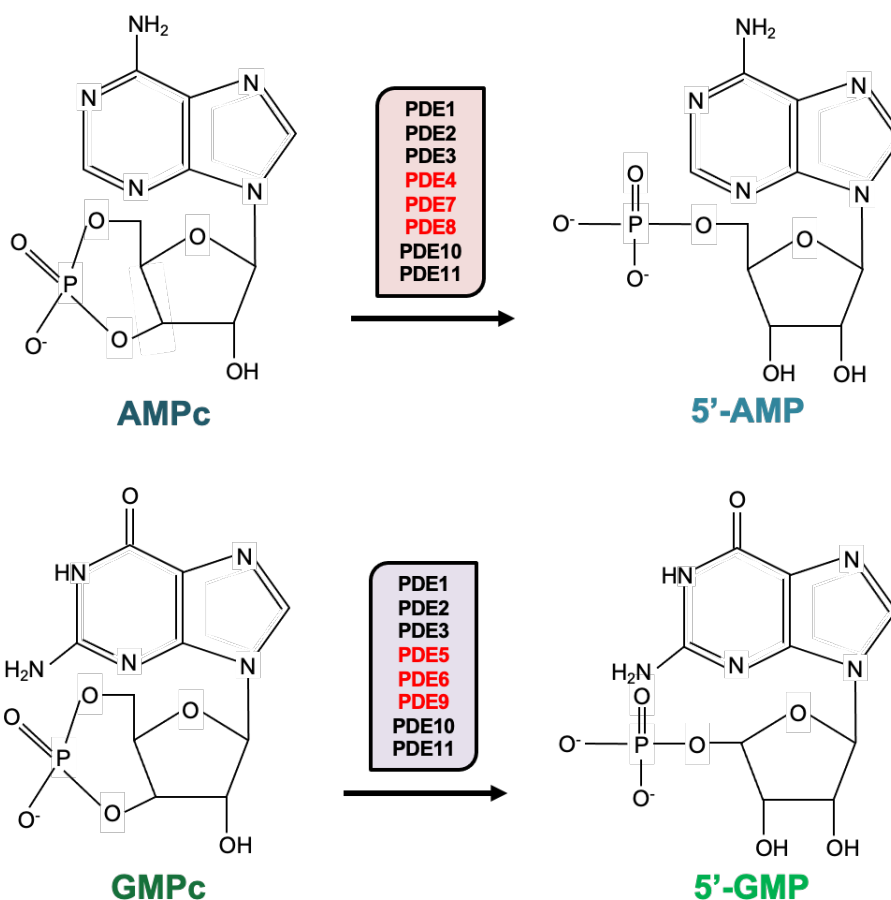


Figura 2. Exemplo do mecanismo de ação de PDE. As reações hidrólise das moléculas de AMPc e GMPc, catalisadas por PDE, originam as moléculas de 5'-AMP e 5'-GMP, respectivamente, devido a quebra da ligação fosfodiéster presente nas moléculas. Em vermelho estão destacadas as PDE específicas para a hidrólise de cada molécula em questão.

Através de análises ômicas, estas enzimas foram encontradas em diversas peçonhas ofídicas, como em *Pseudonaja textilis* (MCCLEARY et al., 2016), *Micrurus dumerilii* (REY-SUÁREZ et al., 2016), *Calloselasma rhodostoma* (TANG et al., 2016) e *Daboia russelli* (TAN et al., 2015a), bem como, dados de transcriptoma também revelam uma grande distribuição de PDE entre serpentes, por exemplo, em *Gloydius intermedius* (YANG et al., 2015) e *Ophiophagus hannah* (TAN et al., 2015b).

Entre essa vasta dispersão de gêneros de serpentes, observa-se que os que mais causam acidentes ofídicos no Brasil, *Bothrops* e *Crotalus*, também apresentam esta enzima na composição de suas peçonhas, como *Bothrops alternatus* (VALÉRIO et al., 2002), *B. atrox* (PHILIPPS, 1976), *B. jararaca* (SANTORO et al., 2009), *C. adamanteus* (PHILIPPS, 1975; STOYNOV et al., 1997), *C. d. terrificus* (PHILIPPS, 1975), *C. ruber ruber* (MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987) e *C. mitchilli pyrrhus* (PERRON; MACKESSY; HYSLOP, 1993).



Estas enzimas possuem alta massa molecular (~90-160 kDa), apresentando-se como uma única cadeia polipeptídica ou como um homo ou heterodímero (MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; PERRON; MACKESSY; HYSLOP, 1993; VALÉRIO et al., 2002; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010; AL-SALEH; KHAN, 2011; FOX, 2013; TRUMMAL et al., 2014). Seu ponto isoelétrico (pI) varia entre 7,4 e 10,5 (PHILIPPS, 1975; MORI; NIKAI; SUGIHARA, 1987; VALÉRIO et al., 2002; AL-SALEH; KHAN, 2011) e também são metaloglicoproteínas (DOLAPCHIEV; VASSILEVA; KOUMANOV, 1980; KINI; GOWDA, 1984; AL-SALEH; KHAN, 2011).

Apesar de estarem amplamente dispersas entre peçonhas ofídicas, pouco são os estudos sobre suas atividades biológicas frente ao envenenamento (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010). Santoro e colaboradores (2009) observaram que PDE oriundas de *B. jararaca* inibiram a agregação de plaquetas, de forma que, quando induzidas por trombina, ocorria um ligeiro decréscimo na agregação, enquanto, induzidas por ADP, o processo de agregação não ocorria. Já Peng e colaboradores (2011) e Mitra e Bhattacharyya (2014) também verificaram este último efeito, pois as PDE de *Trimeresurus stejnegeri* e *D. russelli*, respectivamente, podem ter sido capazes de hidrolisar ADP, causando este efeito inibitório. Assim, por esta ação, PDE podem servir como ferramentas biológicas no tratamento e na prevenção de patologias que tenham por característica o aumento da agregação plaquetária (MITRA; BHATTACHARYYA, 2014), como Tirofiban (Aggrastat[®]) and Eptifibatide (Integrilin[®]), drogas aprovadas pelo pelo U.S. Food and Drug Administration (FDA, EUA), capazes de inibir a agregação de plaquetas e são oriundas de peçonhas ofídicas (KING, 2011; BORDON et al., 2020).

Outro estudo realizado por Russell, Buess e Woo (1963) mostrou que, a partir da purificação parcial de PDE das peçonhas de *C. adamanteus*, *C. atrox*, *C. viridis helleri*, *C. horridus* e *Vipera russelli*, foi possível observar que estas enzimas levaram a uma crise hipotensora, com diminuição da pressão arterial e depressão locomotora de animais, podendo estes efeitos estarem relacionados com a depleção de AMPc. Este estudo tornou-se muito relevante para o conhecimento desta enzima, pois mostra que existem substratos para PDE na circulação de vítimas que podem levar a hipotensão, mesmo que não ocorram processos citolíticos concomitantes (AIRD, 2002; DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010).

Desde a sua descoberta, as PDE apresentam interesse científico, pois auxiliam na caracterização de ácidos nucléicos e também podem servir como ferramentas de biologia molecular. Entre as nucleases, as PDE são as que mais apresentam estudos em relação a sua caracterização a partir de peçonhas ofídicas (FOX, 2013).



1.5. PDE em humanos e o uso de moléculas inibidoras como medicamentos

É amplamente conhecido que as PDE também são expressas por seres humanos em diversos tecidos e órgãos, como fígado, coração, pulmões, rins, bexiga, uretra, próstata, pênis, útero, músculos esqueléticos e liso vascular (BOSWELL-SMITH; SPINA; PAGE, 2006). Ressalta-se que as PDE5s são expressas em várias regiões do cérebro, e sua alta expressão, atividade, e a diminuição de níveis de GMPc estão intimamente relacionados ao envelhecimento, de forma que, para prevenir este problema e aumentar níveis de GMPc, inibidores de PDE5 podem ser utilizados (EL-BAKLY et al., 2019).

Devido à necessidade terapêutica frente a patologias relacionadas às PDE, a pesquisa e o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir a ação destas enzimas compõem um novo grupo de alvos terapêuticos para algumas enfermidades, como doenças cardiovasculares, inflamatórias, disfunção erétil e a doença de Alzheimer (PÉREZ-TORRES et al., 2003; CASTRO et al., 2005; JEON et al., 2005; UCKERT et al., 2006; MILLER; YAN, 2010; PENG et al., 2011).

Em janeiro de 2021, foi disponibilizada uma lista de Classes Farmacológicas Estabelecidas (EPC, do inglês *Established Pharmacologic Class*) pelo FDA, a qual constam 9 moléculas inibidoras de algumas classes de PDE, como descrito na tabela 2. Entre estas moléculas listadas pela FDA, a que se destaca popularmente é a Sildenafil (Viagra®), muito utilizado para o tratamento de disfunção erétil, pois é uma molécula inibidora de PDE5 com alta seletividade (BALLARD et al., 1998).

Tabela 2. Lista de classes farmacológicas estabelecidas pelo FDA (EUA) em janeiro de 2021.

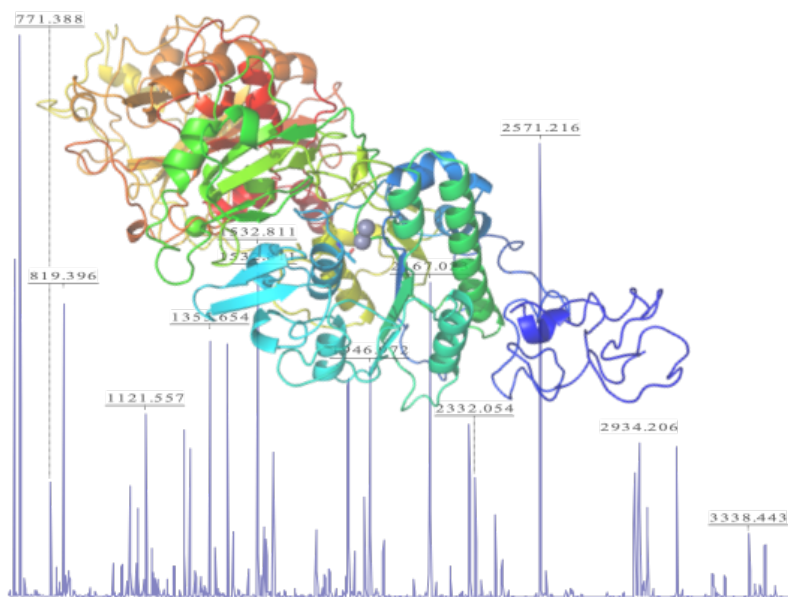
Composto ativo	Nome comercial	Classe de PDE inibida
Cilostazol	Cebralat® (Libbs Farmacêutica)	PDE3
Milrinona	Primacor® (Sanofi)	
Apremilaste	Otezla® (Celgene International Sarl)	PDE4
Crisaborole	Eucrisa® (Anacor Pharmaceuticals Inc.)	
Roflumilaste	Daxas® (AstraZeneca)	
Avanafil	Spedra® (Vivus)	PDE5
Sildenafil	Viagra® (Pfizer)	
Tadalafila	Cialis® (Eli Lilly do Brasil Ltda.)	
Vardenafil	Levitra® (Bayer)	

Dados oriundos do FDA (EUA).



Ainda existem poucos estudos sobre as ações farmacológicas destas enzimas (DHANANJAYA; D'SOUZA, 2010), entretanto o uso de moléculas capazes de inibi-las tem sido amplo. Assim, estudos mais aprofundados devem ser realizados para ampliar a compreensão desta classe enzimática e suas ações em processos fisiológicos e patológicos, bem como durante os casos de envenenamentos ofídicos.





5. Conclusões

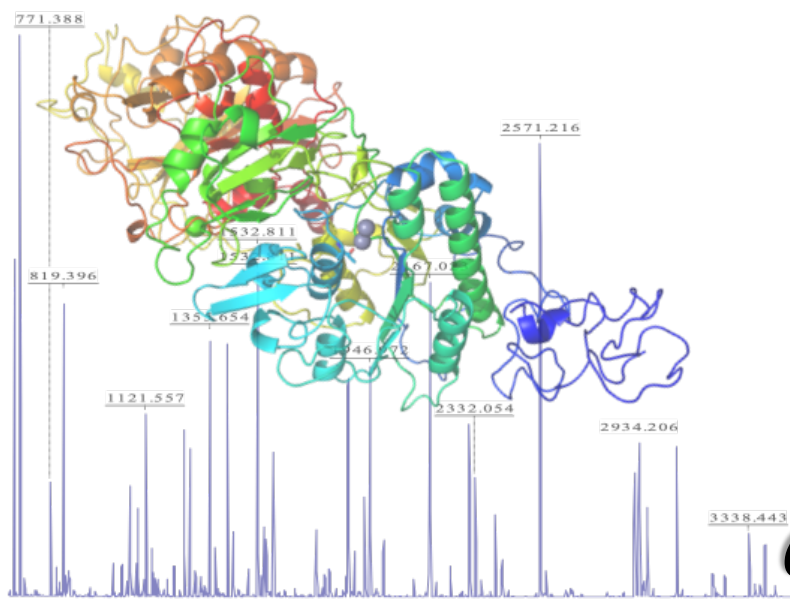
A partir do estudo proposto e os resultados obtidos foi possível determinar uma nova metodologia para a purificação de uma nova PDE da peçonha de *C. d. collilineatus*, isto é, *CdcPDE*, bem como caracterizá-la estruturalmente, bioquimicamente e funcionalmente, mesmo que esta esteja em baixas proporções na peçonha.

Ainda são poucos os estudos que abordam PDE de peçonhas ofídicas. Desta forma, o presente estudo contribui positivamente no conhecimento sobre esta classe de enzimas presente em peçonhas ofídicas, sendo fonte de dados sobre sua estrutura proteica, atividade enzimática, termoestabilidade e citotoxicidade, bem como sua interação com o substrato *bis(p-nitrofenil)-fosfato*.

Este estudo foi pioneiro em evidenciar a ação citotóxica da *CdcPDE* em queratinócitos humanos, o que pode despertar curiosidade para explorar os efeitos locais de envenenamentos por cascavéis. Além disso, estas enzimas podem ser importantes ferramentas moleculares para a pesquisa, bem como, para a terapêutica, visto que apresentam funções biológicas capazes de interferir tanto processos fisiológicos como patológicos, como o processo de agregação de plaquetas.

Por fim, este estudo encontra-se publicado em revista de âmbito internacional, a *International Journal of Biological Macromolecules*, com fator de impacto de 5.162, intitulado “*Unraveling the structure and function of CdcPDE: A novel phosphodiesterase from Crotalus durissus collilineatus snake venom*”, neste ano de 2021 (doi: 10.1016/j.ijbiomac.2021.02.120). Além do artigo científico, de acordo com os indicadores da CAPES (CAPES, 2019), este estudo também resultou em 3 adicionais produtos tecnológicos não patenteáveis: um novo método de purificação para essa classe de proteína, uma nova sequência de proteína e um novo modelo estrutural.





6. Referências

- AHMADI, S. et al. An in Vitro Methodology for Discovering Broadly-Neutralizing Monoclonal Antibodies. **Scientific Reports**, v. 10, n. 1, p. 10765, dez. 2020.
- AIRD, S. D. Ophidian Envenomation Strategies and the Role of Purines. **Toxicon**, v. 40, n. 4, p. 335–393, abr. 2002.
- ALEXANDER, G. et al. Gyroxin, a Toxin from the Venom of *Crotalus Durissus Terrificus*, Is a Thrombin-like Enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953–960, 1988.
- AL-SALEH, S. S. M.; KHAN, S. Purification and Characterization of Phosphodiesterase I from *Walterinnesia Aegyptia* Venom. **Preparative Biochemistry & Biotechnology**, v. 41, n. 3, p. 262–77, 2011.
- AL-SALEH, S. S. M.; KHAN, S. U.; ASHRAF, M. Biochemical Characterization and Some Biological Properties of the Phosphodiesterase I Purified from *Agistrodon Bilineatus* Venom. **Indian Journal of Biochemistry and Biophysics**, v. 46, p. 221–229, 2009.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Gapped BLAST and PSI-BLAST: A New Generation of Protein Database Search Programs. **Nucleic Acids Research**, v. 25, n. 17, p. 3389–3402, 1 set. 1997.
- ALTSCHUL, S. F. et al. Protein Database Searches Using Compositionally Adjusted Substitution Matrices. **The FEBS journal**, v. 272, n. 20, p. 5101–5109, out. 2005.
- ARAÚJO, L. da S. et al. *Crotalus Durissus* Venom: Biological Effects and Relevant Applications. A Review. **Revista Brasileira de Higiene e Sanidade Animal**, v. 10, n. 1, 2016. Disponível em: <<http://www.gnresearch.org/doi/10.5935/1981-2965.20160002>>. Acesso em: 24 fev. 2021.
- ARLINGHAUS, F. T.; EBLE, J. A. C-Type Lectin-like Proteins from Snake Venoms. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 60, n. 4, p. 512–519, 15 set. 2012.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HERING, S. E. Acidentes por animais peçonhentos: serpentes peçonhentas. **Medicina (Ribeirao Preto. Online)**, v. 36, n. 2/4, p. 480, 30 dez. 2003.
- BAKKEN, G. S.; KROCHMAL, A. R. The Imaging Properties and Sensitivity of the Facial Pits of Pitvipers as Determined by Optical and Heat-Transfer Analysis. **Journal of Experimental Biology**, v. 210, n. 16, p. 2801–2810, 15 ago. 2007.
- BALLARD, S. A. et al. Effects of Sildenafil on the Relaxation of Human Corpus Cavernosum Tissue in Vitro and on the Activities of Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase Isozymes. **The Journal of Urology**, v. 159, n. 6, p. 2164–2171, jun. 1998.
- BARBOSA, C. F. et al. Determination of the Neutralizing Potency of Horse Antivenom against Bothropic and Crotalic Venoms by Indirect Enzyme Immunoassay. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v. 28, n. 10, p. 1077–1080, out. 1995.
- BELLUOMINI, H. E. Conhecimentos sobre as serpentes brasileiras e medidas de prevenção de acidentes. **Revista Brasileira de Saúde Ocupacional**, v. 12, n. 45, p. 82–96, 1984.
- BJÖRK, W. Purification of Phosphodiesterase from *Bothrops Atrax* Venom, with Special Consideration of the Elimination of Monophosphatases. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 238, p. 2487–2490, jul. 1963.
- BOIVIN, S.; KOZAK, S.; MEIJERS, R. Optimization of Protein Purification and Characterization Using Thermofluor Screens. **Protein Expression and Purification**, v. 91, n. 2, p. 192–206, out. 2013.



- BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Snake Venomics and Antivenomics of *Crotalus Durissus* Subspecies from Brazil: Assessment of Geographic Variation and Its Implication on Snakebite Management. **Journal of Proteomics**, v. 73, n. 9, p. 1758–1776, ago. 2010.
- BOLDRINI-FRANÇA, J. et al. Minor Snake Venom Proteins: Structure, Function and Potential Applications. **Biochimica Et Biophysica Acta. General Subjects**, v. 1861, n. 4, p. 824–838, abr. 2017.
- BOLON, I. et al. Identifying the Snake: First Scoping Review on Practices of Communities and Healthcare Providers Confronted with Snakebite across the World. **PLOS ONE**, v. 15, n. 3, p. e0229989, 5 mar. 2020.
- BON, C. et al. Crotoxin, Half-Century of Investigations on a Phospholipase A2 Neurotoxin. **Acta Physiologica Et Pharmacologica Latinoamericana: Organo De La Asociacion Latinoamericana De Ciencias Fisiologicas Y De La Asociacion Latinoamericana De Farmacologia**, v. 39, n. 4, p. 439–448, 1989.
- BORDON, K. C. F. et al. Isolation, Enzymatic Characterization and Antiedematogenic Activity of the First Reported Rattlesnake Hyaluronidase from *Crotalus Durissus Terrificus* Venom. **Biochimie**, v. 94, n. 12, p. 2740–2748, dez. 2012.
- BORDON, K. de C. F. et al. From Animal Poisons and Venoms to Medicines: Achievements, Challenges and Perspectives in Drug Discovery. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 1132, 24 jul. 2020.
- BOSWELL-SMITH, V.; SPINA, D.; PAGE, C. P. Phosphodiesterase Inhibitors. **British Journal of Pharmacology**, v. 147, n. S1, p. S252–S257, jan. 2006.
- BRAZIL, I. V. **A defesa contra o ofidismo**. São Paulo: Pocar & Weiss, 1911.
- BREMEL, R. D.; HOMAN, E. J. An Integrated Approach to Epitope Analysis I: Dimensional Reduction, Visualization and Prediction of MHC Binding Using Amino Acid Principal Components and Regression Approaches. **Immune Research**, v. 6, n. 1, p. 7, 2010.
- BULLOCK, T. H.; COWLES, R. B. Physiology of an Infrared Receptor: The Facial Pit of Pit Vipers. **Science (New York, N.Y.)**, v. 115, n. 2994, p. 541–543, 16 maio 1952.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake Venomics. Strategy and Applications. **Journal of Mass Spectrometry**, v. 42, n. 11, p. 1405–1414, nov. 2007.
- CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The venomous reptiles of Latin America**. [s.l.] Cornell Univ. Press, Ithaca, 2004. v. 65
- CAPES. **Produção Técnica**. [s.l.: s.n.]
- CASTRO, A. et al. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Their Role in Immunomodulatory Responses: Advances in the Development of Specific Phosphodiesterase Inhibitors. **Medicinal Research Reviews**, v. 25, n. 2, p. 229–244, mar. 2005.
- CHANG, C. C.; SU, M. J. A Study on the Interaction of Crotoxin with Crotoxin Phospholipase A2, Notexin and Other Presynaptic Neurotoxins. **British Journal of Pharmacology**, v. 73, n. 2, p. 495–503, jun. 1981.
- CHOUMET, V. et al. Snake-Venom Phospholipase A2 Neurotoxins. **European Journal of Biochemistry**, v. 211, n. 1–2, p. 57–62, 1993.
- CLISSA, P. B. **Otimização da atenuação da toxicidade do veneno crotálico irradiado e estudo de**



- suas propriedades imonológicas.** 1997. Universidade de São Paulo, 1997.
- COLOVOS, C.; YEATES, T. O. Verification of Protein Structures: Patterns of Nonbonded Atomic Interactions. **Protein Science**, v. 2, n. 9, p. 1511–1519, set. 1993.
- CORPET, F. Multiple Sequence Alignment with Hierarchical Clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881–10890, 25 nov. 1988.
- COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades Federativas: Lista de espécies. **Herpetologia Brasileira**, v. 7, n. 1, 2018.
- CUMMINGS, M. D.; FARNUM, M. A.; NELEN, M. I. Universal Screening Methods and Applications of ThermoFluor. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 11, n. 7, p. 854–863, out. 2006.
- DA SILVA, M. H.; BIER, O. G. Titration of Antiserum to South American Rattlesnake (*Crotalus Durissus Terrificus*) Venom by Inhibition of Phospholipase A2 Activity. **Toxicon**, v. 20, n. 3, p. 563–569, 1 jan. 1982.
- DELEZENNE, C.; MOREL, H. Action catalytique des venins des serpents sur les acides nucleiques. **Comptes rendus de l'Académie des Sciences**, n. 168, p. 244–246, 1919.
- DHANANJAYA, B. L.; D'SOUZA, C. J. M. An Overview on Nucleases (DNase, RNase, and Phosphodiesterase) in Snake Venoms. **Biochemistry. Biokhimiia**, v. 75, n. 1, p. 1–6, jan. 2010.
- DOLAPCHIEV, L. B.; VASSILEVA, R. A.; KOUMANOV, K. S. Venom Exonuclease. II. Amino Acid Composition and Carbohydrate, Metal Ion and Lipid Content in the *Crotalus Adamanteus* Venom Exonuclease. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 622, n. 2, p. 331–336, 25 abr. 1980.
- DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. **Toxicon**, v. 40, n. 6, p. 659–665, jun. 2002.
- EDMAN, P.; BEGG, G. A Protein Sequenator. **European Journal of Biochemistry**, v. 1, n. 1, p. 80–91, mar. 1967.
- EL-BAKLY, W. et al. The Efficacy and Underlying Mechanism of Phosphodiesterase- 5 Inhibitors in Preventing Cognitive Impairment and Alzheimer Pathology: A Systematic Review of Animal Studies. **Behavioural Brain Research**, v. 372, p. 112004, out. 2019.
- FERREIRA-JÚNIOR, R. S. **Avaliação da resposta humoral e da capacidade de neutralização do soro de camundongos Swiss inoculados com venenos nativo e irradiado com cobalto-60 de serpentes *Crotalus durissus terrificus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*.** 2003. Universidade Estadual Paulista, Faculdade de Medicina de Botucatu, São Paulo, 2003. Disponível em: <<http://hdl.handle.net/11449/87829>>.
- FOX, J. W. A Brief Review of the Scientific History of Several Lesser-Known Snake Venom Proteins: L-Amino Acid Oxidases, Hyaluronidases and Phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75–82, fev. 2013.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural Considerations of the Snake Venom Metalloproteinases, Key Members of the M12 Reprolysin Family of Metalloproteinases. **Toxicon**, Snake toxins and hemostasis. v. 45, n. 8, p. 969–985, 15 jun. 2005.
- FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of Key Events in Snake Venom Metalloproteinase Research. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200–209, 6 mar. 2009.
- FRANCISCHETTI, I. M. et al. Convulxin, a Potent Platelet-Aggregating Protein from *Crotalus Durissus Terrificus* Venom, Specifically Binds to Platelets. **Toxicon: Official Journal of the**



International Society on Toxinology, v. 35, n. 8, p. 1217–1228, ago. 1997.

FRY, B. G. et al. Evolution of an Arsenal: Structural and Functional Diversification of the Venom System in the Advanced Snakes (Caenophidia). **Molecular & cellular proteomics: MCP**, v. 7, n. 2, p. 215–246, fev. 2008.

GASANOV, S. E. et al. Cobra Venom Cytotoxin Free of Phospholipase A 2 and Its Effect on Model Membranes and T Leukemia Cells. **Journal of Membrane Biology**, v. 155, n. 2, p. 133–142, 15 jan. 1997.

GEORGATSOS, J. G.; LASKOWSKI, M. Purification of an Endonuclease from the Venom of *Bothrops Atrax* *. **Biochemistry**, v. 1, n. 2, p. 288–295, 1 mar. 1962.

GONÇALVES, J. M.; VIEIRA, L. G. Estudos sobre venenos de serpentes brasileiras. I. Análise eletroforética. **Anais da Academia Brasileira de Ciências**, v. 22, p. 141–150, 1950.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. SwissDock, a Protein-Small Molecule Docking Web Service Based on EADock DSS. **Nucleic Acids Research**, v. 39, n. Web Server issue, p. W270–277, jul. 2011a.

GROSDIDIER, A.; ZOETE, V.; MICHIELIN, O. Fast Docking Using the CHARMM Force Field with EADock DSS. **Journal of Computational Chemistry**, v. 32, n. 10, p. 2149–2159, 30 jul. 2011b.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Hemorrhage Caused by Snake Venom Metalloproteinases: A Journey of Discovery and Understanding. **Toxins**, v. 8, n. 4, p. 93, abr. 2016.

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite Envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 1–21, 14 set. 2017.

HABIB, A. G. et al. Snakebite is Under Appreciated: Appraisal of Burden from West Africa. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 9, n. 9, 23 set. 2015. Disponível em: <<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4580425/>>. Acesso em: 23 abr. 2020.

HALIM, H. Y. et al. Purification and Characterization of Phosphodiesterase (Exonuclease) from *Cerastes Cerastes* (Egyptian Sand Viper) Venom. **Toxicon**, v. 25, n. 11, p. 1199–1207, 1987.

HARRISON, R. A. et al. Snake Envenoming: A Disease of Poverty. **PLoS neglected tropical diseases**, v. 3, n. 12, p. e569, 22 dez. 2009.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological Roles of the Two Components of Crotoxin. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 68, n. 7, p. 1560–1563, jul. 1971.

HIGUCHI, S. et al. A Novel Peptide from the ACEI/BPP-CNP Precursor in the Venom of *Crotalus Durissus Collilineatus*. **Comparative biochemistry and physiology. Toxicology & pharmacology: CBP**, v. 144, n. 2, p. 107–121, out. 2006.

IBRAHIM, N. M.; SALAMA, W. H.; HAKIM, A. E. E. Phosphodiesterase Activity of Some Egyptian Snake Venoms: Biochemical and Immunological Characteristics and Effect on Blood Coagulation of Phosphodiesterase Enzyme from *Naja Nigricollis* Venom. **Journal of Chemical and Pharmaceutical Research**, v. 8, n. 8, p. 11, 2016.

IWANAGA, S.; SUZUKI, T. Enzymes in snake venom. In: **Snake Venoms**. Berlin/Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1979. p. 61–158.

JACKSON, K. The Evolution of Venom-Conducting Fangs: Insights from Developmental Biology. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 975–981, 1 jun. 2007.



- JENSEN, P. H. et al. Structural Analysis of N- and O-Glycans Released from Glycoproteins. **Nature Protocols**, v. 7, n. 7, p. 1299–1310, 7 jun. 2012.
- JEON, Y. H. et al. Phosphodiesterase: Overview of Protein Structures, Potential Therapeutic Applications and Recent Progress in Drug Development. **Cellular and molecular life sciences: CMLS**, v. 62, n. 11, p. 1198–1220, jun. 2005.
- KAVEH-BAGHBADERANI, Y. et al. Selective Release of Overexpressed Recombinant Proteins from *E. Coli* Cells Facilitates One-Step Chromatographic Purification of Peptide-Tagged Green Fluorescent Protein Variants. **Protein Expression and Purification**, v. 152, p. 155–160, dez. 2018.
- KING, G. F. Venoms as a Platform for Human Drugs: Translating Toxins into Therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, n. 11, p. 1469–1484, nov. 2011.
- KINI, R. M.; GOWDA, T. V. Rapid Method for Separation and Purification of Four Isoenzymes of Phosphodiesterase from *Trimeresurus Flavoviridis* (Habu Snake) Venom. **Journal of Chromatography A**, v. 291, p. 299–305, jan. 1984.
- LAEMMLI, U. K. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, n. 5259, p. 680–685, 15 ago. 1970.
- LAING, G. D. et al. Inflammatory Pathogenesis of Snake Venom Metalloproteinase-Induced Skin Necrosis. **European Journal of Immunology**, v. 33, n. 12, p. 3458–3463, dez. 2003.
- LASKOWSKI, R. A. et al. PROCHECK: a program to check the stereochemical quality of protein structures. **Journal of Applied Crystallography**, v. 26, n. 2, p. 283–291, 1 abr. 1993.
- LASKOWSKI, Roman A. et al. AQUA and PROCHECK-NMR: Programs for Checking the Quality of Protein Structures Solved by NMR. **Journal of Biomolecular NMR**, v. 8, n. 4, dez. 1996. Disponível em: <<http://link.springer.com/10.1007/BF00228148>>. Acesso em: 28 out. 2020.
- LAUSTSEN, A. H. et al. Pros and Cons of Different Therapeutic Antibody Formats for Recombinant Antivenom Development. **Toxicon**, v. 146, p. 151–175, maio 2018.
- LEMA, T.; ARAÚJO, M. L.; AZEVEDO, A. C. P. Contribuição ao conhecimento da alimentação e do modo alimentar de serpentes do Brasil. **Comunicações do Museu de Ciências da PUCRS, Zool.** v. 26, n. 1, p. 41–121, 1983.
- LIRA-DA-SILVA, R. M. et al. A contribuição de Vital Brazil para a medicina tropical: dos envenenamentos à especificidade da soroterapia. **Anais do Instituto de Higiene e Medicina Tropical**, p. 27- 32 Páginas, 24 jun. 2018.
- MACARTNEY, J. M. Diet of the Northern Pacific Rattlesnake, *Crotalus viridis oreganus*, in British Columbia. **Herpetologica**, v. 45, n. 3, p. 299–304, 1989.
- MACKESSY, S. P. Phosphodiesterases, ribonucleases and deoxyribonucleases. In: **Enzymes from Snake Venoms**. [s.l.] Alaken Press Inc.: Fort Collins, CO, 1998. p. 361–404.
- MARCHLER-BAUER, A. et al. CDD: NCBI's Conserved Domain Database. **Nucleic Acids Research**, v. 43, n. D1, p. D222–D226, 28 jan. 2015.
- MARLAS, G. Isolation and Characterization of the α and β Subunits of the Platelet-Activating Glycoprotein from the Venom of *Crotalus Durissus Cascavella*. **Biochimie**, v. 67, n. 12, p. 1231–1239, 1 dez. 1985.
- MARQUES, O.; MEDEIROS, C. **Nossas incríveis serpentes: caracterização, biologia, acidentes e conservação**. 1. ed. Cotia (Brasil): Ponto A, 2018.



- MASSIMI, M. et al. Increase of Intracellular Cyclic AMP by PDE4 Inhibitors Affects HepG2 Cell Cycle Progression and Survival. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 6, p. 1401–1411, 2017.
- MCCLEARY, R. J. R. et al. Proteomic Comparisons of Venoms of Long-Term Captive and Recently Wild-Caught Eastern Brown Snakes (*Pseudonaja Textilis*) Indicate Venom Does Not Change Due to Captivity. **Journal of Proteomics**, v. 144, p. 51–62, jul. 2016.
- MEDEIROS, J. M. et al. Fatal Rattlesnake Envenomation in Northernmost Brazilian Amazon: A Case Report and Literature Overview. **Reports — Medical Cases, Images, and Videos**, v. 3, n. 2, p. 9, 8 abr. 2020.
- MEHATS, C. et al. Cyclic Nucleotide Phosphodiesterases and Their Role in Endocrine Cell Signaling. **Trends in Endocrinology & Metabolism**, v. 13, n. 1, p. 29–35, 1 jan. 2002.
- MELGAREJO, A. R. Serpentes peçonhentas do Brasil. In: **Animais peçonhentos no Brasil: biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. São Paulo: Sarvier Editora, 2003. p. 33–61.
- MILLER, C. L.; YAN, C. Targeting Cyclic Nucleotide Phosphodiesterase in the Heart: Therapeutic Implications. **Journal of Cardiovascular Translational Research**, v. 3, n. 5, p. 507–515, out. 2010.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. Brasil: Ministério da Saúde, Fundação Nacional de Saúde, 1998.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília: Fundação Nacional de Saúde, 2001.
- MINISTÉRIO DA SAÚDE. **Acidentes por animais peçonhentos - Notificações registradas no Sistema de Informação de Agravos de Notificação - Brasil**. Disponível em: <<http://tabnet.datasus.gov.br/cgi/deftohtm.exe?sinannet/cnv/animaisbr.def>>. Acesso em: 16 fev. 2021.
- MITRA, J.; BHATTACHARYYA, D. Phosphodiesterase from *Daboia Russelli Russelli* Venom: Purification, Partial Characterization and Inhibition of Platelet Aggregation. **Toxicon**, v. 88, p. 1–10, set. 2014.
- MOREMEN, K. W.; TIEMEYER, M.; NAIRN, A. V. Vertebrate Protein Glycosylation: Diversity, Synthesis and Function. **Nature Reviews. Molecular Cell Biology**, v. 13, n. 7, p. 448–462, 22 jun. 2012.
- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. Phosphodiesterase from the Venom of *Crotalus Ruber Ruber*. **The International Journal of Biochemistry**, v. 19, n. 2, p. 115–119, 1987.
- MORSA, D. et al. Multi-Enzymatic Limited Digestion: The Next-Generation Sequencing for Proteomics? **Journal of Proteome Research**, v. 18, n. 6, p. 2501–2513, 7 jun. 2019.
- MURRAY, K. A.; MARTIN, G.; IWAMURA, T. Focus on Snake Ecology to Fight Snakebite. **The Lancet**, v. 395, n. 10220, p. e14, jan. 2020.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Aminoácidos, peptídeos e proteínas. In: **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l.] ArtMed, 2014a. p. 75–114.
- NELSON, D. L.; COX, M. M. Enzimas. In: **Princípios da bioquímica de Lehninger**. 6. ed. [s.l.] ArtMed, 2014b. p. 189–242.
- NIESEN, F. H.; BERGLUND, H.; VEDADI, M. The Use of Differential Scanning Fluorimetry to Detect Ligand Interactions That Promote Protein Stability. **Nature Protocols**, v. 2, n. 9, p. 2212–2221, set. 2007.



- OGAWA, T. et al. Molecular Diversity and Accelerated Evolution of C-Type Lectin-like Proteins from Snake Venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 45, n. 1, p. 1–14, jan. 2005.
- OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; RÁDIS-BAPTISTA, G. New View on Crotamine, a Small Basic Polypeptide Myotoxin from South American Rattlesnake Venom. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 46, n. 4, p. 363–370, 15 set. 2005.
- OLIVEIRA, I. S. et al. Cell Migration Inhibition Activity of a Non-RGD Disintegrin from *Crotalus Durissus Collilineatus* Venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 28, dez. 2018.
- OLIVEIRA, I. S. et al. Global Proteomic and Functional Analysis of *Crotalus Durissus Collilineatus* Individual Venom Variation and Its Impact on Envenoming. **Journal of Proteomics**, v. 191, p. 153–165, 16 2019.
- PANTOLIANO, M. W. et al. High-Density Miniaturized Thermal Shift Assays as a General Strategy for Drug Discovery. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 6, n. 6, p. 429–440, dez. 2001.
- PAPPIN, D. J.; HOJRUP, P.; BLEASBY, A. J. Rapid Identification of Proteins by Peptide-Mass Fingerprinting. **Current biology: CB**, v. 3, n. 6, p. 327–332, 1 jun. 1993.
- PEIGNEUR, S. et al. Crotamine Pharmacology Revisited: Novel Insights Based on the Inhibition of KV Channels. **Molecular Pharmacology**, v. 82, n. 1, p. 90–96, 1 jul. 2012.
- PENG, L. et al. Purification and Partial Characterization of a Novel Phosphodiesterase from the Venom of *Trimeresurus Stejnegeri*: Inhibition of Platelet Aggregation. **Biochimie**, v. 93, n. 9, p. 1601–1609, set. 2011.
- PÉREZ-TORRES, S. et al. Alterations on Phosphodiesterase Type 7 and 8 Isozyme MRNA Expression in Alzheimer's Disease Brains Examined by in Situ Hybridization. **Experimental Neurology**, v. 182, n. 2, p. 322–334, ago. 2003.
- PERRON, S.; MACKESSY, S. P.; HYSLOP, R. M. Purification and characterization of exonuclease from rattlesnake venom. **Journal of the Colorado-Wyoming Academy of Science**, v. 25, p. 21–22, 1993.
- PERRY, M. J.; HIGGS, G. A. Chemotherapeutic Potential of Phosphodiesterase Inhibitors. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 2, n. 4, p. 472–481, ago. 1998.
- PETTERSEN, E. F. et al. UCSF Chimera--a Visualization System for Exploratory Research and Analysis. **Journal of Computational Chemistry**, v. 25, n. 13, p. 1605–1612, out. 2004.
- PHILIPPS, G. R. Purification and Characterization of Phosphodiesterase from Crotalus Venom. **Hoppe-Seyler's Zeitschrift Fur Physiologische Chemie**, v. 356, n. 7, p. 1085–1096, jul. 1975.
- PHILIPPS, G. R. Purification and Characterization of Phosphodiesterase I from *Bothrops Atrax*. **Biochimica Et Biophysica Acta**, v. 432, n. 2, p. 237–244, 3 maio 1976.
- PIERINI, S. V. et al. High Incidence of Bites and Stings by Snakes and Other Animals among Rubber Tappers and Amazonian Indians of the Juruá Valley, Acre State, Brazil. **Toxicon**, v. 34, n. 2, p. 225–236, fev. 1996.
- POKLAR, N. et al. PH and Temperature-Induced Molten Globule-like Denatured States of Equinatoxin II: A Study by UV-Melting, DSC, Far- and near-UV CD Spectroscopy, and ANS Fluorescence. **Biochemistry**, v. 36, n. 47, p. 14345–14352, 25 nov. 1997.



- PUCCA, M. B. et al. Electrophysiological Characterization of the First *Tityus Serrulatus* Alpha-like Toxin, Ts5: Evidence of a pro-Inflammatory Toxin on Macrophages. **Biochimie**, v. 115, p. 8–16, ago. 2015.
- PUCCA, M. B. et al. Unity Makes Strength: Exploring Intraspecies and Interspecies Toxin Synergism between Phospholipases A2 and Cytotoxins. **Frontiers in Pharmacology**, v. 11, p. 611, 7 maio 2020.
- QUINTON, L. et al. Fourier Transform Mass Spectrometry: A Powerful Tool for Toxin Analysis. **Toxicon: Official Journal of the International Society on Toxinology**, v. 47, n. 6, p. 715–726, maio 2006.
- RADVANYI, F. et al. Binding of Crotoxin, a Presynaptic Phospholipase A2 Neurotoxin, to Negatively Charged Phospholipid Vesicles. **Journal of Neurochemistry**, v. 53, n. 4, p. 1252–1260, out. 1989.
- REY-SUÁREZ, P. et al. Integrative Characterization of the Venom of the Coral Snake *Micrurus Dumerilii* (Elapidae) from Colombia: Proteome, Toxicity, and Cross-Neutralization by Antivenom. **Journal of Proteomics**, v. 136, p. 262–273, mar. 2016.
- RIVEL, M. et al. Pathogenesis of Dermonecrosis Induced by Venom of the Spitting Cobra, *Naja Nigricollis*: An Experimental Study in Mice. **Toxicon**, v. 119, p. 171–179, set. 2016.
- RUSSELL, F. E.; BUESS, F. W.; WOO, M. Y. Zootoxicological Properties of Venom Phosphodiesterase. **Toxicon**, v. 1, n. 3, p. 99–108, 1 out. 1963.
- SAHA, S.; RAGHAVA, G. P. S. Prediction of Continuous B-Cell Epitopes in an Antigen Using Recurrent Neural Network. **Proteins**, v. 65, n. 1, p. 40–48, 1 out. 2006.
- SANTORO, M. L. et al. NPP-BJ, a Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase from *Bothrops Jararaca* Snake Venom, Inhibits Platelet Aggregation. **Toxicon**, v. 54, n. 4, p. 499–512, 15 set. 2009.
- SCHENBERG, S. Geographical Pattern of Crotamine Distribution in the Same Rattlesnake Subspecies. **Science**, v. 129, n. 3359, p. 1361–1363, 15 maio 1959.
- SCHWEDE, T. et al. SWISS-MODEL: An Automated Protein Homology-Modeling Server. **Nucleic Acids Research**, v. 31, n. 13, p. 3381–3385, 1 jul. 2003.
- SEGOVIA, M.; FIGUEROA, F. L. Detection of a 3', 5'-Cyclic-AMP Phosphodiesterase Activity in the Lichenized Fungus *Evernia Prunastri*. **Plant Biosystems - An International Journal Dealing with all Aspects of Plant Biology**, v. 141, n. 1, p. 123–127, mar. 2007.
- SELVANAYAGAM, Z. E.; GOPALAKRISHNAKONE, P. Tests for Detection of Snake Venoms, Toxins and Venom Antibodies: Review on Recent Trends (1987-1997). **Toxicon**, v. 37, n. 4, p. 565–586, abr. 1999.
- SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake Venom Serine Proteinases: Sequence Homology vs. Substrate Specificity, a Paradox to Be Solved. **Toxicon**, Snake toxins and hemostasis. v. 45, n. 8, p. 1115–1132, 15 jun. 2005.
- SIVALINGAM, G. N.; SHEPHERD, A. J. An Analysis of B-Cell Epitope Discontinuity. **Molecular Immunology**, v. 51, n. 3–4, p. 304–309, jul. 2012.
- STOWELL, S. R.; JU, T.; CUMMINGS, R. D. Protein Glycosylation in Cancer. **Annual Review of Pathology**, v. 10, p. 473–510, 2015.
- STOYNOV, S. S. et al. Single-Strand-Specific DNase Activity Is an Inherent Property of the 140-KDa Protein of the Snake Venom Exonuclease. **FEBS letters**, v. 409, n. 2, p. 151–154, 9 jun. 1997.



- STRACK, R. Solving the Primary Structure of Peptides. **Nature Methods**, v. 12, n. 1, p. 11–11, out. 2015.
- SUGIHARA, H. et al. Purification and Characterization of Phosphodiesterase from the Venom of *Trimeresurus Mucrosquamatus*. **The International Journal of Biochemistry**, v. 18, n. 3, p. 203–207, 1986.
- TABORDA, A. R. et al. A Study of the Desoxyribonuclease Activity of Snake Venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 195, n. 1, p. 207–213, mar. 1952a.
- TABORDA, A. R. et al. A Study of the Ribonuclease Activity of Snake Venoms. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 194, n. 1, p. 227–233, jan. 1952b.
- TAN, N. H. et al. Functional Venomics of the Sri Lankan Russell's Viper (*Daboia Russelii*) and Its Toxinological Correlations. **Journal of Proteomics**, v. 128, p. 403–423, 14 out. 2015a.
- TAN, C. H. et al. Venom-gland transcriptome and venom proteome of the Malaysian king cobra (*Ophiophagus hannah*). **BMC Genomics**, v. 16, n. 1, p. 687, 10 set. 2015b.
- TANG, E. L. H. et al. Venomics of *Calloselasma Rhodostoma*, the Malayan Pit Viper: A Complex Toxin Arsenal Unraveled. **Journal of Proteomics**, v. 148, p. 44–56, 04 2016.
- THEAKSTON, R. D.; LLOYD-JONES, M. J.; REID, H. A. Micro-ELISA for Detecting and Assaying Snake Venom and Venom-Antibody. **Lancet**, v. 2, n. 8039, p. 639–641, 24 set. 1977.
- THOMAZINI, I. A.; BARRAVIERA, B.; BARRAVIERA, B. Alterações hematológicas nos acidentes por animais peçonhentos. In: **Venenos animais: uma visão integrada**. Rio de Janeiro: Editora de Publicações Científicas, 1994. p. 81–96.
- TOKARNIA, C. H. et al. Quadros clínico-patológicos do envenenamento ofídico por *Crotalus durissus terrificus* e *Bothrops* spp. em animais de produção. **Pesquisa Veterinária Brasileira**, v. 34, n. 4, p. 301–312, abr. 2014.
- TOYAMA, M. H. et al. Isolation and Characterization of a Convulxin-like Protein from *Crotalus Durissus Collilineatus* Venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 20, n. 7, p. 585–591, out. 2001.
- TRUMMAL, K. et al. Phosphodiesterase from *Vipera Lebetina* Venom - Structure and Characterization. **Biochimie**, v. 106, p. 48–55, nov. 2014.
- UCKERT, S. et al. Update on Phosphodiesterase (PDE) Isoenzymes as Pharmacologic Targets in Urology: Present and Future. **European Urology**, v. 50, n. 6, p. 1194–1207; discussion 1207, dez. 2006.
- UETZ, P. **The Reptile Database**. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org>>. Acesso em: 16 mar. 2020.
- ULLAH, A. et al. The Sequence and a Three-Dimensional Structural Analysis Reveal Substrate Specificity among Snake Venom Phosphodiesterases. **Toxins**, v. 11, n. 11, p. 625, nov. 2019.
- UZAWA, S. Über Die phosphomonoesterase und die phosphodiesterase. **The Journal of Biochemistry**, v. 15, n. 1, p. 19–28, 1932.
- VALÉRIO, A. A. et al. Purification and Characterization of a Phosphodiesterase from *Bothrops Alternatus* Snake Venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 21, n. 8, p. 495–503, nov. 2002.
- VARGAFTIG, B. B. et al. Activation of Guinea-Pig Platelets Induced by Convulxin, a Substance Extracted from the Venom of *Crotalus Durissus Cascavella*. **European Journal of Pharmacology**, v.



68, n. 4, p. 451–464, 19 dez. 1980.

VONK, F. J. et al. Evolutionary Origin and Development of Snake Fangs. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 630–633, jul. 2008.

WARRELL, D. A. Snake Bite. **Lancet (London, England)**, v. 375, n. 9708, p. 77–88, 2 jan. 2010.

WARRELL, D. A. Venomous Bites, Stings, and Poisoning. **Infectious Disease Clinics of North America**, v. 26, n. 2, p. 207–223, jun. 2012.

WATERHOUSE, A. et al. SWISS-MODEL: Homology Modelling of Protein Structures and Complexes. **Nucleic Acids Research**, v. 46, n. W1, p. W296–W303, 2 jul. 2018.

WHO. **Snakebite envenoming - Key facts 2019**. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>>. Acesso em: 22 abr. 2020.

WIEZEL, G. A. et al. In-Depth Venome of the Brazilian Rattlesnake *Crotalus Durissus Terrificus*: An Integrative Approach Combining Its Venom Gland Transcriptome and Venom Proteome. **Journal of Proteome Research**, v. 17, n. 11, p. 3941–3958, 02 2018.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (ed.). **Rabies and envenomings: a neglected public health issue ; report of a consultative meeting, World Health Organization, Geneva, 10 January 2007**. Geneva: WHO, 2007.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Guidelines for the production, control and regulation of snake antivenom immunoglobulins**. [s.l: s.n.]

YANG, Z.-M. et al. Transcriptome and Proteome of the Highly Neurotoxic Venom of *Gloydius Intermedius*. **Toxicon**, v. 107, n. Pt B, p. 175–186, 1 dez. 2015.

YATES, J. R. Mass Spectrometry. From Genomics to Proteomics. **Trends in genetics: TIG**, v. 16, n. 1, p. 5–8, jan. 2000.

ZALATAN, J. G. et al. Structural and Functional Comparisons of Nucleotide Pyrophosphatase/Phosphodiesterase and Alkaline Phosphatase: Implications for Mechanism and Evolution,. **Biochemistry**, v. 45, n. 32, p. 9788–9803, 1 ago. 2006.

