

**NATÁLIA CRISTINA SANTOS COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIBACTERIANO E ANTITUMORAL DE UMA L-AMINOÁCIDO  
OXIDASE ISOLADA DE *Bothrops jararacussu***

Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural, para obtenção de título de  
*Magister Scientiae*.

**VIÇOSA  
MINAS GERAIS – BRASIL  
2012**

**Ficha catalográfica preparada pela Seção de Catalogação e  
Classificação da Biblioteca Central da UFV**

T

C837c  
2012

Costa, Natália Cristina Santos, 1987-

Caracterização parcial e avaliação do potencial antibacteriano e antitumoral de uma L - aminoácido oxidase isolada de *Bothrops jararacussu* / Natália Cristina Santos Costa. – Viçosa, MG, 2012.

xvi, 54f. : il. (algumas col.) ; 29cm.

Orientador: Leandro Licursi de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Viçosa.

Referências bibliográficas: f. 48-54.

1. Cobra. 2. Agentes antiinfeciosos. 3. Câncer - Tratamento. 4. Peptídeos. 5. *Bothrops jararacussu*. I. Universidade Federal de Viçosa. II. Título.

CDD 22. ed.

**NATÁLIA CRISTINA SANTOS COSTA**

**CARACTERIZAÇÃO PARCIAL E AVALIAÇÃO DO POTENCIAL  
ANTIBACTERIANO E ANTITUMORAL DE UMA L-AMINOÁCIDO  
OXIDASE ISOLADA DE *Bothrops jararacussu***

Dissertação apresentada a  
Universidade Federal de Viçosa, como  
parte das exigências do Programa de  
Pós-Graduação em Biologia Celular e  
Estrutural, para obtenção de título de  
*Magister Scientiae*.

APROVADA: 19 de Janeiro de 2012.

---

Prof. Luciano Gomes Fietto

---

Prof<sup>ª</sup>. Maria Cristina Baracat-Pereira

---

Prof. Leandro Licursi de Oliveira  
(Orientador)

*Dedico este trabalho:*

*Aos meus pais*

*Aos meus irmãos*

*Ao meu namorado*

*AMO muito vocês!*

*“Comece fazendo o que é necessário, depois o que é possível, e de repente você estará fazendo o impossível.”*

**São Francisco de Assis**

## **AGRADECIMENTOS**

A Deus, por ter me dado esta oportunidade e ter me guiado em todos os momentos para que eu chegasse até aqui.

Ao meu orientador Prof. Dr. Leandro Licursi, pela orientação durante o desenvolvimento deste projeto, pelos ensinamentos, essenciais para meu crescimento científico e pessoal, pela atenção e dedicação.

Ao meu coorientador Prof. Dr. Sérgio Oliveira de Paula, pelo apoio e incentivo, e pelas oportunidades e confiança depositada.

À Universidade Federal de Viçosa e ao Departamento de Biologia Geral, pela oportunidade de realização do mestrado.

A CAPES, pelo apoio financeiro concedido para a realização desta pesquisa.

Ao Prof. Renato Neves Feio, pela colaboração com este projeto, cedendo-nos os venenos.

À Prof<sup>a</sup>. Maria Cristina Dantas Vanetti, por disponibilizar as cepas bacterianas utilizadas neste projeto.

Ao Núcleo de Análise de Biomoléculas, NuBioMol, pelo permissão do uso de equipamentos essenciais para o desenvolvimento do trabalho.

À grande amiga e irmã de coração, Monise, por todos os dias convvidos, pelas experiências e momentos de desespero e risos compartilhados.

À Lorena, amiga e companheira de laboratório, pelo apoio e pela imensa ajuda com o cultivo de células utilizadas neste projeto.

Ao João Lúcio, técnico do laboratório, pela amizade e pelos momentos de descontração.

A todos os amigos do Laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicoimunologia, pela amizade, apoio e colaboração.

À Ancély, Michelle e Iana, minhas grandes amigas e companheiras desde a graduação, por tantos momentos de convívio e experiências compartilhadas.

Aos meus queridos pais, João e Fátima, pela imensa dedicação, confiança e apoio durante estes sete anos de UFV.

Aos meus irmãos, Leandro e Lucas, pelo apoio, incentivo e ajuda em todos os momentos que precisei.

Ao meu namorado, Maciel, pelo companheirismo e amizade, pela compreensão e apoio em todos os momentos, e por ter paciência de me esperar e conviver com essa saudade doída por tantos anos.

A todos da minha família que estiveram comigo durante esta jornada.

A todos que de alguma forma contribuíram para a realização deste trabalho.

## BIOGRAFIA

**Natália Cristina Santos Costa**, filha de João Gualberto Costa e de Cleusa Fátima Santos Costa, nasceu no dia 18 de julho de 1987 na cidade de Capitólio, MG.

Cursou o ensino médio no Colégio Losango, em Piumhi, MG, sendo concluído em 2004.

Em março de 2005 ingressou no curso de Bioquímica da Universidade Federal de Viçosa, obtendo seu título de graduação em Bioquímica em janeiro de 2010.

Em março de 2010 ingressou no curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural, do Departamento de Biologia Geral da Universidade Federal de Viçosa, concentrando seus estudos na área de Biologia das Células e dos Tecidos.

Defendeu sua dissertação em 19 de janeiro de 2012 para obtenção do título de *Magister Scientiae*.



## SUMÁRIO

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS.....	x
LISTA DE FIGURAS .....	xi
LISTA DE TABELAS.....	xii
RESUMO .....	xiii
ABSTRACT .....	xv
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>01</b>
<b>2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA .....</b>	<b>03</b>
2.1. Uma breve caracterização das serpentes .....	03
2.2. A glândula e o seu produto: o veneno .....	04
2.3. Principais componentes dos venenos de serpentes do gênero <i>Bothrops</i> .....	07
2.3.1. Metaloproteases .....	07
2.3.2. Serinoproteases .....	08
2.3.3. Fosfolipases .....	08
2.3.4. Desintegrinas .....	09
2.3.5. Peptídeos biologicamente ativos .....	09
2.3.6. Lectinas .....	09
2.3.7. Fatores de crescimento.....	10
2.3.8. L-aminoácido oxidases.....	10
2.4. Aplicações farmacológicas .....	12
2.4.1. Antimicrobianos.....	12
2.4.2. Anticarcinogênicos .....	15
<b>3. OBJETIVOS .....</b>	<b>20</b>
3.1. Objetivo geral.....	20
3.2. Objetivos específicos.....	20
<b>4. MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>21</b>
4.1. Material biológico.....	21
4.2. Purificação da L-aminoácido oxidase de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	21

4.2.1. Cromatografia de afinidade em <i>Sepharose-Con A</i> .....	21
4.2.2. Cromatografia de troca iônica .....	22
4.2.3. Determinação da concentração protéica .....	22
4.3. Caracterização bioquímica .....	23
4.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE).....	23
4.3.2. Perfil de peptídeos trípticos .....	23
4.3.2.1. Digestão tríptica da proteína .....	23
4.3.2.2. Espectrometria de massa .....	24
4.3.2.3. Pesquisa no banco de dados .....	24
4.3.3. Determinação da sequência N-terminal .....	25
4.3.4. Ensaio de atividade para LAAO e especificidade enzimática..	25
4.4. Ensaio biológicos .....	25
4.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana .....	25
4.4.1.1. Ensaio preliminar .....	25
4.4.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima .....	26
4.4.1.3. Determinação da concentração bactericida mínima ....	26
4.4.1.4. Análise do potencial bactericida.....	27
4.4.2. Efeito citotóxico sobre células tumorais.....	27
4.4.2.1. Cultura de células tumorais.....	27
4.4.2.2. Análise da viabilidade celular .....	27
4.4.3. Efeito citotóxico sobre eritrócitos .....	28
4.5. Análise estatística .....	28
<b>5. RESULTADOS E DISCUSSÃO.....</b>	<b>29</b>
5.1. Isolamento da LAAO de <i>B. jararacussu</i> .....	29
5.2. Caracterização bioquímica .....	34
5.2.1. Estimativa da massa molecular por SDS-PAGE .....	34
5.2.2. Perfil de peptídeos trípticos .....	34
5.2.3. Análise da sequência N-terminal .....	35
5.2.4. Especificidade enzimática .....	36
5.3. Ensaio biológicos .....	38
5.3.1. Avaliação da atividade antimicrobiana .....	38
5.3.1.1. Determinação da concentração inibitória mínima .....	38

5.3.1.2. Determinação da concentração bactericida mínima ....	40
5.3.1.3. Análise do potencial bactericida.....	42
5.3.2. Efeito citotóxico sobre células tumorais.....	44
5.3.3. Efeito citotóxico sobre eritrócitos .....	46
<b>6. CONCLUSÕES.....</b>	<b>47</b>
<b>7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS .....</b>	<b>48</b>

## LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

<b>ACN</b>	Acetonitrila
<b>ATCC</b>	<i>American Type Culture Collection</i>
<b>B.</b>	Gênero <i>Bothrops</i>
<b>B16F10</b>	Linhagem celular de melanoma murino
<b>Balt-LAAO-I</b>	L-aminoácido oxidase I de <i>Bothrops alternatus</i>
<b>BCA</b>	Ácido bicinconínico
<b>BjussuLAAO-I</b>	L-aminoácido oxidase I de <i>Bothrops jararacussu</i>
<b>BmooLAAO-I</b>	L-aminoácido oxidase I de <i>Bothrops moojeni</i>
<b>Boleu-LAAO</b>	L-aminoácido oxidase I de <i>Bothrops leucurus</i>
<b>BSA</b>	Soro albumina bovina
<b>CIM</b>	Concentração inibitória mínima
<b>CBM</b>	Concentração bactericida mínima
<b>Con A</b>	Concanavalina A
<b>DMEN</b>	Meio de cultura <i>Eagle</i> modificado
<b>DMSO</b>	Dimetilsulfóxido
<b>DTT</b>	Ditiotreitol
<b>FPLC</b>	<i>Fast Protein Liquid Chromatography</i>
<b>LAAO</b>	L-aminoácido oxidase
<b>MALDI</b>	<i>Matrix-assisted laser desorption/ionization</i>
<b>MDA-MB231</b>	Linhagem celular de adenocarcinoma de mama humano
<b>MTT</b>	3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il) 2,5-difenil brometo de tetrazolim
<b>OPD</b>	o-Fenilenediamina
<b>PMF</b>	<i>Peptide Mass Fingerprinting</i>
<b>SDS</b>	Dodecil Sulfato de Sódio
<b>SDS-PAGE</b>	Eletroforese em gel de poliacrilamida contendo SDS
<b>Tris</b>	Tris hidroximetilaminometano
<b>TFA</b>	Ácido trifluoroacético
<b>U</b>	Unidade de atividade enzimática

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1.</b> Desaminação oxidativa de um L-aminoácido por uma L-aminoácido oxidase .....	11
<b>Figura 2.</b> Perfil cromatográfico do veneno bruto de <i>B. jararacussu</i> obtido por cromatografia de afinidade a concanavalina A .....	29
<b>Figura 3.</b> Cromatografia de troca iônica da fração de glicoproteínas em coluna MonoQ.....	30
<b>Figura 4.</b> Atividade antimicrobiana das frações obtidas contra <i>S. aureus</i> através de ensaio de difusão em ágar .....	31
<b>Figura 5.</b> Perfil protéico das frações contidas nos tubos 41 a 58 submetidas à SDS-PAGE após coloração por prata.....	31
<b>Figura 6.</b> Cromatografia de troca iônica da fração MQ1 em coluna MonoQ.....	32
<b>Figura 7.</b> Atividade antimicrobiana das frações obtidas contra <i>S. aureus</i> através de ensaio de difusão em ágar .....	32
<b>Figura 8.</b> Perfil protéico das frações contidas nos tubos 14 a 31 submetidas à SDS-PAGE após coloração por prata.....	33
<b>Figura 9.</b> SDS-PAGE após coloração por prata apresentando as bandas do marcador molecular e da proteína purificada.....	34
<b>Figura 10.</b> Sequência de aminoácidos constituintes da BjussuLAAO-I.....	35
<b>Figura 11.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) da LAAO isolada de <i>B. jararacussu</i> contra <i>S. aureus</i> .....	39
<b>Figura 12.</b> Concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico comercial gentamicina contra <i>S. aureus</i> .....	39
<b>Figura 13.</b> Concentração bactericida mínima (CBM) da LAAO isolada de <i>B. jararacussu</i> contra <i>S. aureus</i> .....	41
<b>Figura 14.</b> Concentração bactericida mínima (CBM) do antibiótico comercial gentamicina contra <i>S. aureus</i> .....	41
<b>Figura 15.</b> Efeito citotóxico da LAAO isolada sobre células B16F10 (melanoma murino) pelo ensaio de MTT .....	44
<b>Figura 16.</b> Efeito citotóxico da LAAO isolada sobre células MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama) pelo ensaio de MTT.....	45
<b>Figura 17.</b> Efeito citotóxico da LAAO isolada sobre eritrócitos humanos ....	46

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1.</b> Dados da purificação mostrando as frações obtidas em cada etapa de purificação.....	33
<b>Tabela 2.</b> Alinhamento da região N-terminal da LAAO caracterizada neste trabalho com LAAOs isoladas de outros venenos de serpentes.....	36
<b>Tabela 3.</b> Atividade específica da LAAO isolada de <i>B. jararacussu</i> em relação aos diferentes L-aminoácidos .....	37
<b>Tabela 4:</b> Espectro de ação da LAAO purificada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.....	43

## RESUMO

COSTA, Natália Cristina Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, janeiro de 2012. **Caracterização parcial e avaliação do potencial antibacteriano e antitumoral de uma L-aminoácido oxidase isolada de *Bothrops jararacussu*.** Orientador: Leandro Licursi de Oliveira. Coorientador: Sérgio Oliveira de Paula.

Os venenos de serpentes são misturas ricas em proteínas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos, os quais representam aproximadamente 90% dos constituintes totais e, provavelmente, são responsáveis por grande parte dos efeitos biológicos do veneno. A L-aminoácido oxidase (LAAO) é uma das enzimas encontradas nos venenos e muitos são os efeitos atribuídos a esta enzima: antimicrobiano, indutor de apoptose, agregação plaquetária, anti-câncer, dentre outros. Considerando a abrangência de ações das LAAOs, o objetivo deste trabalho foi caracterizar bioquimicamente uma LAAO isolada do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e avaliar seu potencial antibacteriano e antitumoral. O isolamento da LAAO de *B. jararacussu* envolveu três etapas de purificação: uma cromatografia de afinidade à concanavalina A e duas etapas de cromatografia por troca iônica em coluna MonoQ. O alto grau de pureza da proteína foi confirmado por SDS-PAGE, e a massa molecular estimada foi de aproximadamente 68 kDa. A LAAO isolada apresentou maior especificidade enzimática por L-Fen, seguida por L-Met e L-Arg. O perfil de peptídeos trípticos revelou homologia com outra LAAO já isolada de *B. jararacussu*, porém a sequência N-terminal obtida (ATNRNPLYYYQFRRTDYFIF) mostrou 56% de identidade com essa enzima, podendo se tratar de uma nova LAAO obtida de *B. jararacussu*. A LAAO isolada apresentou atividade antimicrobiana contra bactérias Gram-negativas - *Proteus vulgaris* (CIM 25 µg/mL, CBM 50 µg/mL) e *Citrobacter freundii* (CIM 100 µg/mL, CBM 100 µg/mL) e Gram-positivas - *Listeria monocytogenes* (CIM 25 µg/mL), *Bacillus cereus* (CIM 400 µg/mL), *Bacillus subtilis* (CIM 100 µg/mL, CBM 200 µg/mL) e *Staphylococcus aureus* (CIM 50 µg/mL, CBM 50 µg/mL). Para esta última cepa a LAAO mostrou ser mais efetiva que a gentamicina. A LAAO apresentou efeito citotóxico de

aproximadamente 100% sobre as duas linhagens de células tumorais estudadas (B16F10 e MDA-MB-231), quando administrada na concentração de 1 µg/mL. Porém, nesta mesma concentração não apresentou nenhum efeito citotóxico sobre eritrócitos humanos. Desta forma, é possível inferir que os métodos empregados para o isolamento da LAAO foram eficientes e que se trata de uma enzima multifuncional com potencial uso terapêutico. Sugere-se o desenvolvimento de estudos voltados a esta temática com o intuito de ampliar a caracterização desta enzima e avaliar outras potenciais ações bioativas.



## ABSTRACT

COSTA, Natália Cristina Santos, M. Sc., Universidade Federal de Viçosa, January, 2012. **Partial characterization and evaluation of antibacterial and antitumor potential of an L-amino acid oxidase obtained of *Bothrops jararacussu***. Adviser: Leandro Licursi de Oliveira. Co-Adviser: Sérgio Oliveira de Paula.

Snake venoms are rich sources of proteins, enzymes and peptides, which represent 90% of the total constituents and probably are responsible for most of its biological effects. The L-amino acid oxidase (LAAO) is a component of venom and has antimicrobial, platelet aggregation-inducing, apoptotic-inducing and anti-cancer activities. Considering the actions of the LAAOs, this work aims to characterize an isolated LAAO from crude venom of *Bothrops jararacussu* and evaluate its antibacterial and antitumor potential. The LAAO isolation involved three purification steps: an affinity chromatography on Con A-Sepharose column and two steps of ion exchange chromatography on MonoQ column. The protein purity was confirmed by SDS-PAGE and the obtained molecular mass was 68 kDa. The isolated LAAO showed higher affinity to L-Phe, followed by L-Met and L-Arg. The tryptic peptides profile revealed homology to other isolated LAAO from *B. jararacussu*, but the N-terminal sequence (ATNRNPLYQFRRTDYFIF) displayed 56% identity with this enzyme, and therefore may be a new LAAO from *B. jararacussu*. The isolated LAAO showed antimicrobial activity against Gram-negative – *Proteus vulgaris* (MIC 25 µg/mL, MBC 50 µg/mL) and *Citrobacter freundii* (MIC 100 µg/mL, MBC 100 µg/mL) – and Gram-positive – *Listeria monocytogenes* (MIC 25 µg/mL), *Bacillus cereus* (MIC 400 µg/mL), *Bacillus subtilis* (MIC 100 µg/mL, MBC 200 µg/mL) and *Staphylococcus aureus* (MIC 50 µg/mL, MBC 50 µg/mL), for which this enzyme was more effective than gentamicin. The LAAO displayed a cytotoxic effect of nearly 100% over two tumor cell lines studied (B16F10 and MDA-MB-231) when the enzyme was administrated at concentration 1 µg/mL. However the LAAO in this same concentration did not show any cytotoxic effect over human erythrocytes, which suggested that it's a multifunctional enzyme with

therapeutic potential. The development of further studies involving this theme is necessary in order to enlarge enzyme characterization and to evaluate other potential bioactive actions.

## 1. INTRODUÇÃO

A descoberta e o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos são tarefas árduas, pois requerem longos períodos de pesquisas e altos investimentos por parte do setor farmacêutico. Em todo o mundo são muitas as tentativas de desenvolvimento de novos antibióticos e drogas antitumorais obtidas de fontes naturais. A grande biodiversidade dos venenos faz deles fontes únicas de compostos bioativos e de modelos estruturais, a partir dos quais novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos. Venenos de diferentes espécies animais (serpentes, escorpiões, anfíbios, dentre outros) e seus componentes ativos, principalmente proteínas e peptídeos, têm mostrado grande potencial terapêutico contra bactérias patogênicas e o câncer (Gomes *et al.*, 2010).

Os venenos de serpentes são misturas complexas de substâncias, produzidas e estocadas em uma glândula altamente especializada. As proteínas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos representam de 90 a 95% dos constituintes totais e, provavelmente, são responsáveis por grande parte dos efeitos tóxicos do veneno (Deshimaru *et al.*, 1996). Dentre as proteínas encontradas estão as metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases, desintegrinas, lectinas e L-aminoácido oxidases. Outros componentes presentes nos venenos são os aminoácidos livres, aminas biogênicas, carboidratos, lipídios, nucleotídeos, riboflavina, ácidos orgânicos e íons (Meier e Stocker, 1995; Odell *et al.*, 1998; Odell *et al.*, 1999). Muitos desses componentes ativam uma variedade de processos biológicos, sendo capazes de imobilizar suas presas ou seus inimigos. Algumas dessas moléculas, porém, podem ser utilizadas em benefício da saúde humana.

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são glicoproteínas que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos aos seus correspondentes  $\alpha$ -cetoácidos com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia. Nos últimos anos, estas enzimas se tornaram objetos de interesse para estudos devido a seus efeitos apoptótico, citotóxico, indutor de agregação plaquetária e antimicrobiano. Parte dos efeitos biológicos parece ser mediado pelo peróxido de hidrogênio gerado no processo de oxidação. As LAAOs são encontradas em diversos organismos e, possivelmente, os

venenos de serpentes são as principais fontes da enzima. Outras potenciais atividades relacionadas às LAAOs se referem as ações anti-HIV, anticoagulante e anticâncer (Tan e Fung, 2008), tratando-se, portanto, de proteínas multifuncionais com promissoras aplicações biomédicas.

## 2. REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

### 2.1. Uma breve caracterização das serpentes

As serpentes, também denominadas ofídios, são animais vertebrados que compõem a subordem *Ofidia*, ordem *Squamata* e classe *Reptilia*. No mundo, são conhecidas aproximadamente 3.000 espécies de serpentes, distribuídas entre 20 famílias e 465 gêneros (Sajevic *et al.*, 2011). No Brasil, há representantes de 9 famílias, 75 gêneros e 321 espécies, um pouco mais de 10% do total de espécies já descobertas (Pough e Groves, 1983).

As características morfológicas e fisiológicas das serpentes compreendem: corpo alongado, coberto por escamas, ausência de membros locomotores e ouvido externo (os sons são transmitidos por vibrações do maxilar e do crânio), olhos desprovidos de pálpebras móveis e língua bífida (as informações químicas são transportadas por meio da língua até o órgão de Jacobson, o qual desempenha função semelhante ao olfato). Os órgãos internos das serpentes são como os dos demais vertebrados, porém são de formato alongado, sendo estes animais desprovidos de bexiga. A urina é expelida juntamente com as fezes, através da cloaca (Hoge e Romano-Hoge, 1978; Arnold, 1983; Pough e Groves, 1983).

Algumas espécies de ofídios são consideradas venenosas ou peçonhentas, por possuírem glândulas secretoras de veneno localizadas de cada lado da cabeça, recobertas por músculos compressores e conectadas, através de ductos, às presas, estruturas especializadas inoculadoras de veneno. Estas presas têm tamanho diferenciado dos demais dentes e podem estar localizadas nas porções anterior ou posterior da boca (Zug *et al.*, 2000).

As serpentes peçonhentas pertencem à superfamília *Colubroidea* e estão classificadas em quatro famílias, a saber: *Colubridae* (1.600 espécies, presentes em todos os continentes, exceto na Antártica), *Elapidae* (250 espécies, presentes em todos os continentes, exceto Antártica), *Atractaspidae* (60 espécies encontradas na África e Ásia), e *Viperidae* (200 espécies, ausentes na Austrália e Antártica; na América estão representadas por víboras com fossetas nasais termorreceptoras) (Sajevic *et al.*, 2011). Em

geral, as pesquisas no campo da medicina têm como objeto de estudo especialmente as espécies pertencentes à família *Viperidae*.

Todas as espécies da família *Viperidae* são capazes de inocular veneno com extrema eficiência, pois apresentam maior sofisticação em seu aparato de captura. Sua dentição é solenóglifa (presas são retráteis), e se localizam na porção frontal do maxilar, cujos ductos funcionam como uma espécie de agulha hipodérmica, o que faz com que a picada ocorra mesmo através de tecidos muito espessos. Esta família é dividida em duas subfamílias: *Crotalinae* e *Viperinae* (Zug *et al.*, 2000).

Todos os viperídeos do novo mundo pertencem à subfamília *Crotalinae* e possuem como principal característica morfológica a presença de fossetas loreais, órgão especializado na localização da presa através de pequenas variações de temperatura detectadas no ambiente por dois orifícios localizados entre os olhos e as narinas. Dentro deste grupo existem três gêneros que juntos são responsáveis pela maior parte dos acidentes ofídicos no Brasil: a) *Bothrops* (Jararacas), representado por aproximadamente 24 espécies que são responsáveis por cerca de 90% dos acidentes; b) *Crotalus* (Cascavéis), para o qual 5 espécies já foram catalogadas no país e apresentam como característica a presença de um chocalho na ponta da cauda; c) *Lachesis* (Surucucus), no Brasil representado pela única espécie *Lachesis muta* que possui como característica espinhos na região posterior da cauda e é a maior serpente venenosa das Américas. Os viperídeos, que pertencem à subfamília *Viperinae*, são chamados víboras verdadeiras. Abundantes na África, sudoeste asiático e na Europa, incluem a víbora-negra (*Vipera berus*), a víbora-de-ariete africana (*Bitis arietans*) e a víbora do norte da África (*Cerastes cornutus*) (Zug *et al.*, 2000).

## **2.2. A glândula e o seu produto: o veneno**

O aparato produtor de veneno das serpentes é composto por glândulas exócrinas modificadas, compostas por tecidos que possuem grande capacidade não somente de produção, mas também de armazenamento e secreção de veneno (Markland, 1998). Este tecido pode

ser considerado o mais especializado em termos de expressão de proteínas com uma função particular – a síntese de toxinas, já que a contribuição dos transcritos associados à produção de toxinas em relação ao transcriptoma total das células da glândula é de aproximadamente 56% de todos os RNA mensageiros (Junqueira-de-Azevedo e Ho, 2002).

Acredita-se que durante o processo evolutivo das serpentes peçonhentas, parte do aparato digestório, principalmente as glândulas salivares e pancreática, tenha se diferenciado num tecido especializado, quase que exclusivamente, para a produção de veneno. Durante este processo a saliva e outras secreções gástricas passaram a fornecer as bases para a formação do veneno (Boisbouvier *et al.*, 1998), isto porque o veneno é o mais concentrado fluido produzido, armazenado e secretado por um organismo vertebrado, possuindo de 18 a 52% de massa seca, enquanto que o suco gástrico, por exemplo, possui de 0,5 a 1% (Vogt *et al.*, 1989).

Tamanho grau de especialização torna o epitélio das glândulas de veneno um tecido de características muito particulares (Boisbouvier *et al.*, 1998). A alta especialização da glândula de veneno é observada, por exemplo, no gênero *Bothrops*, onde se verifica a expressão intensa de um variado número de famílias de proteínas (metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases e lectinas) e uma diversidade de toxinas expressas em menor quantidade (fatores de crescimento de nervos, RNases, etc.), o que contribui para complexidade protéica do veneno (Fry *et al.*, 2003). A variedade de compostos, especialmente proteínas, enzimas e peptídeos biologicamente ativos, encontrada no veneno representa de 90 a 95% do constituinte total e, provavelmente, é responsável pela totalidade dos efeitos gerados (Deshimaru *et al.*, 1996).

Esta diversidade de proteínas é, em geral, resultado de genes parálogos que se duplicaram e passaram por um processo acelerado de evolução (Nakashima *et al.*, 1993; Nakashima *et al.*, 1995; Deshimaru *et al.*, 1996). Isto é compatível com o modelo de nascimento e morte de multigenes dentro das famílias protéicas, que inclui três tipos de eventos: duplicação de genes ou domínios (nascimento), eliminação de genes ou domínios (morte) e inovação, quando novos genes surgem de seqüências não codificáveis (Fry e Wuster, 2004). Surpreendentemente, muitos elementos de

transposição, do tipo retrotransposon, foram encontrados nas sequências que codificam as toxinas, o que possivelmente contribui para o aumento do número de nascimentos e da diversificação estrutural dentro das famílias de proteínas e, por conseguinte, gera novas atividades tóxicas. Este processo pode ser observado em várias famílias protéicas constituintes do veneno, sendo que esta correlação de similaridade existe dentro das famílias de proteínas e não entre as diferentes famílias (Kordis e Gubensek, 1997).

Vale ressaltar que a síntese de toxinas na glândula de veneno está condicionada aos níveis estocados no lúmen glandular. Tal produção é reflexo do estado de atividade da serpente, sendo a síntese do veneno induzida pela inoculação ou esvaziamento da glândula (Bdolah, 1979). Como em outros epitélios, acredita-se que este processo de secreção seja diretamente regulado por íons  $Ca^{+2}$  (Peters e Mayer, 1998), os quais estão envolvidos na rápida liberação dos grânulos de secreção celular para o lúmen da glândula, onde o veneno é armazenado (Oron e Bdolah, 1978).

Os venenos de serpentes são usados tanto no mecanismo de defesa como de ataque. Eles contêm componentes direcionados para imobilização e morte de suas presas bem como para facilitar o processo de digestão (Hider *et al.*, 1991). De modo geral, são constituídos de neurotoxinas, cardiotoxinas, miotoxinas e outros fatores como os inibidores de agregação plaquetária (desintegrinas). Dentre as proteínas consideradas não-tóxicas, estão as lectinas, fatores de crescimento de nervos, fatores de crescimento de vasos endoteliais e enzimas com pouca ou nenhuma toxicidade, como a catalase, desidrogenase láctica, alanina amino-transferase, lisofosfolipase, fosfatase alcalina, fosfodiesterase, desoxiribonuclease, ribonuclease I, hialuronidase, amilase, heparinase e NAD nucleosidase. Dentre os componentes não protéicos encontramos os aminoácidos, aminas biogênicas, carboidratos, lipídios, nucleotídeos, riboflavina, ácidos orgânicos, íons e uma grande quantidade de agentes quelantes (Meier e Stocker, 1995; Odell *et al.*, 1998; Odell *et al.*, 1999).

Não são todas as moléculas proteínas citadas que estão presentes qualitativamente nos venenos das diferentes espécies de serpentes. Ainda, elas podem variar entre serpentes da mesma espécie devido a fatores como dieta, sazonalidade, habitat e idade (Chippaux *et al.*, 1991).



### **2.3. Principais componentes dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops***

Os venenos dos ofídios do gênero *Bothrops* contêm uma mistura complexa de proteínas com e sem atividade enzimática, proteínas de baixa massa molecular e peptídeos, com atividades químicas e biológicas distintas. Em geral, a hialuronidase está presente nos venenos das serpentes deste gênero, o que explica a rápida absorção pelo aumento da perfusão através dos tecidos; assim como se constata a existência de hemotoxinas e citolisinas, que causam inflamação local, necrose e dano ao epitélio vascular; e, fosfolipase A<sub>2</sub> e esterase, que alteram a permeabilidade da membrana e fazem com que histaminas e bradicininas sejam liberadas (Mendez e Riet-Correa, 1995). O veneno também possui ação proteolítica ou necrosante, coagulante, hemorrágica e neurotóxica (Mendez e Riet-Correa, 1995). Tais características estão associadas a determinadas famílias protéicas que são apresentadas a seguir, de acordo com as atividades que desempenham.

#### **2.3.1. Metaloproteases**

As metaloproteases são hidrolases do tipo endopeptidases que dependem da ligação a um metal, geralmente o zinco, em seu sítio catalítico, para a realização de suas funções enzimáticas. As metaloproteases de veneno de serpente compreendem um grupo de enzimas que faz parte da família M1-2B da superfamília conhecida como metzincinas que possui o motivo “*Met-turn*” que se caracteriza pela presença de uma metionina em uma volta da estrutura terciária localizada na porção C-terminal do motivo de zinco (Birkedal-Hansen, 1995). Nos venenos do gênero *Bothrops* estas enzimas são os principais fatores hemorrágicos causadores dos mais drásticos efeitos provocados pelo veneno e, por isso, são geralmente chamadas de fatores hemorrágicos ou hemorraginas (Sajevic *et al.*, 2011).

### **2.3.2. Serinoproteases**

As serinoproteases são enzimas capazes de hidrolisar ligações peptídicas utilizando mecanismos covalentes de catálise, através de uma tríade de resíduos formada por His, Asp e Ser. Semelhante à tripsina, elas clivam cadeias polipeptídicas na porção C-terminal de resíduos de aminoácidos positivamente carregados (Sajevic *et al.*, 2011). Elas são produzidas como zimogênios inativos, sendo necessária a proteólise para fazer com que o sítio ativo adquira a conformação catalítica eficiente. As serinoproteases presentes nos venenos botrópicos são caracterizadas principalmente como enzimas com atividade do tipo trombina e de maneira geral afetam a cascata de coagulação pela ativação dos componentes sanguíneos envolvidos na coagulação, fibrinólise e agregação plaquetária e também pela degradação proteolítica das células, causando um desequilíbrio no sistema homeostático da presa (Murayama *et al.*, 2003; Serrano e Maroun, 2005).

### **2.3.3. Fosfolipases**

As fosfolipases são proteínas dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$  que hidrolisam fosfolipídios de membrana, gerando prostaglandinas, tromboxanos, leucotrienos e outros importantes mediadores inflamatórios, por meio de uma díade catalítica de His/Asp presente em seus sítios ativos (Oka e Arita, 1991; Sajevic *et al.*, 2011). As fosfolipases  $A_2$  ( $\text{PLA}_2$ ) são particularmente abundantes nos venenos do gênero *Bothrops* e possuem como atividades, além da função de hidrólise de fosfolipídio, efeitos cardiotoxícos, anticoagulante, antiplaquetário, hemolítico, inflamatório, miotóxico, convulsivo, indutor de edema e neurotóxico (Moura-da-Silva *et al.*, 1991). Estas atividades estão geralmente associadas ao fato delas afetarem a integridade da membrana plasmática das células e, por conseguinte, a integridade de vasos e artérias (Vishwanath *et al.*, 1987; Lu *et al.*, 2002). O amplo espectro de efeitos farmacológicos correlaciona com sua habilidade para atingir órgãos ou tecidos específicos devido a sua ligação de alta afinidade a receptores de glicoproteínas e glicolipídeos específicos (Sajevic *et al.*, 2011).

#### **2.3.4. Desintegrinas**

As desintegrinas são proteínas de baixa massa molecular (41-83 resíduos de aminoácidos), ricas em Cys e não possuem atividade enzimática. O grande número de pontes dissulfeto presentes em sua estrutura provê uma específica orientação do *loop* composto por uma sequência Arg-Gly-Asp (RGD) que se liga à integrina (receptores de superfície celular). Como exemplo de desintegrinas cita-se a jarastatina, encontrada no veneno de *B. jararaca* e insularina, no veneno de *B. insularis* (Gould *et al.*, 1990). Ao se ligarem às integrinas, as desintegrinas afetam processos celulares nos quais as integrinas estão envolvidas, tais como: agregação plaquetária, migração celular, resposta imune, cicatrização de feridas, invasão tumoral, angiogênese, inflamação e remodelação óssea (Sajevic *et al.*, 2011).

#### **2.3.5. Peptídeos biologicamente ativos**

Existem diversos peptídeos biologicamente ativos isolados de venenos de serpentes e, de modo geral, eles podem apresentar neurotoxicidade (Fry e Wuster, 2004), cardiotoxicidade (Tsetlin e Hucho, 2004) e inibição da atividade plaquetária (Soares *et al.*, 2005). Os mais conhecidos e bem caracterizados são os peptídeos potencializadores de bradicinina (BPPs), primeiramente descritos no veneno de *B. jararaca* (Ferreira *et al.*, 1970), mas agora já reconhecidos em venenos de vários viperídeos. Esses peptídeos apresentam tamanhos variados, mas todos possuem um resíduo piroglutâmico na porção N-terminal e uma estrutura rica em prolina. A atividade anti-hipertensiva dos BPPs está relacionada com a inibição da enzima conversora de angiotensina. A sua descoberta foi essencial para o desenvolvimento de medicamentos usados no tratamento da hipertensão humana, como o captopril (Soares *et al.*, 2005).

#### **2.3.6. Lectinas**

As lectinas do tipo C são proteínas não enzimáticas presentes em venenos de serpentes de todas as famílias (Brinkhous *et al.*, 1983). Elas podem ser classificadas em lectinas tipo C verdadeiras, por se ligarem a mono e oligossacarídeos de uma maneira  $Ca^{+2}$ -dependente; e proteínas

semelhantes a lectinas (*lectin-like*), cujo domínio de ligação ao açúcar não está presente (Sajevic *et al.*, 2011). De maneira geral, são homo ou heterodiméricas, com as subunidades ligadas por pontes dissulfeto entre as cisteínas conservadas na estrutura. Possuem cerca de 130 resíduos de aminoácidos por subunidade e massa molecular de 30 kDa (dímero), podendo apresentar conteúdos variáveis de glicosilação (Zingali *et al.*, 1993; Castro *et al.*, 1998). As lectinas tipo C de venenos de serpentes se ligam a uma ampla variedade de fatores de coagulação e receptores de plaqueta, o que evidencia a presença de mais de um sítio de interação a outras moléculas.

### **2.3.7. Fatores de crescimento**

Há muito já são conhecidos os fatores de crescimento presentes em venenos, principalmente os de crescimento de nervos (Nerve Growth Factor -NGF) e os de crescimento de vasos endoteliais (Vascular Endothelial Growth Factors - VEGFs), estes últimos presentes em quantidades consideráveis nos venenos (Junqueira de Azevedo *et al.*, 2001), porém, pouco se sabe em relação a suas atividades e funções.

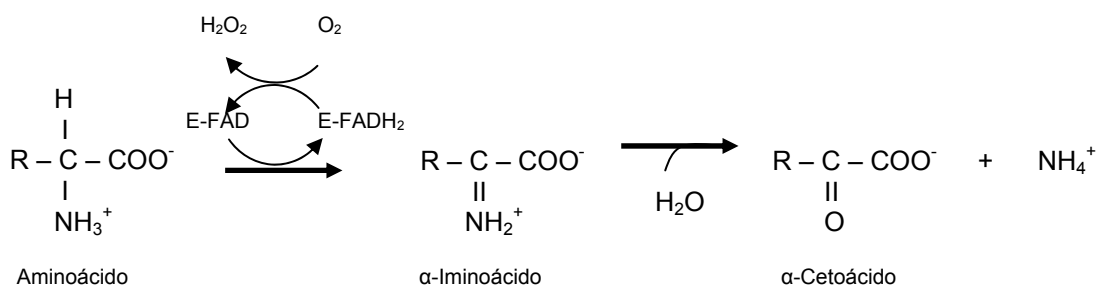
### **2.3.8. L-aminoácido oxidases**

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoproteínas que catalisam a desaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos aos seus correspondentes  $\alpha$ -cetoácidos com a produção de peróxido de hidrogênio e amônia. As LAAOs são encontradas em diversos organismos e, possivelmente, os venenos de serpentes são as principais fontes da enzima (Tan e Fung, 2008).

Comumente, as LAAOs presentes em venenos de serpentes são enzimas homodiméricas com massa molecular de aproximadamente 120-150 kDa e quando na forma monomérica possuem massa molecular de aproximadamente 55-68 kDa. Essas enzimas possuem uma grande variedade de pontos isoelétricos, variando de 4 a 8. Geralmente, estas flavoproteínas possuem duas moléculas de coenzima flavina, as quais exibem máxima absorção a 275, 390 e 462 nm, sendo responsáveis pela cor amarelada dos venenos (Alves *et al.*, 2008; Tan e Fung, 2008).

A LAAO é uma glicoproteína com 3-4% de carboidratos, e em geral, a glicosilação contribui para a heterogeneidade encontrada entre as enzimas (Tan e Fung, 2008). A glicosilação parece ser importante para a secreção e solubilidade da proteína. A remoção de porções glicana da LAAO isolada de *Calloselasma rhodostoma* levou a uma proteína insolúvel (Geyer *et al.*, 2001). A porção glicana também parece desempenhar um papel importante nas ações farmacológicas da enzima, uma vez que permite LAAO ancorar na superfície celular, gerando altas concentrações locais de peróxido de hidrogênio (Tan e Fung, 2008). Entretanto, a deglicosilação da enzima parece não afetar a atividade enzimática *in vitro* (Stábeli *et al.*, 2004; Izidoro *et al.*, 2006).

A oxidação eficaz do L-aminoácido pela enzima requer a presença de um grupo  $\alpha$ -amino livre, e geralmente, os L-aminoácidos hidrofóbicos são os melhores substratos. A reação ocorre em duas etapas, sendo que a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) ou a flavina mononucleotídeo (FMN) são utilizados como cofatores (Figura 1). Durante a reação redutora, o átomo de hidrogênio  $\alpha$  do grupo amino é captado pelo FAD ou FMN, produzindo o intermediário  $\alpha$ -iminoácido, o qual reage com uma molécula de  $H_2O$ , dando origem ao  $\alpha$ -cetoácido. Dois mecanismos alternativos foram propostos para a reação redutora: 1) o mecanismo do carbânion, no qual o próton é transferido, deixando o átomo de carbono  $\alpha$  carregado negativamente; 2) o mecanismo de transferência de hidreto, no qual o átomo de hidrogênio e os dois elétrons são transferidos simultaneamente. Dados recentes são consistentes com o mecanismo de transferência direta de hidreto (Tan e Fung, 2008).



**Figura 1.** Desaminação oxidativa de um L-aminoácido por uma L-aminoácido oxidase.

Nos últimos anos, LAAOs se tornaram objetos de interesse para estudos devido a seus efeitos apoptótico, citotóxico, indutor de agregação plaquetária e antimicrobiano. Esses efeitos biológicos parecem ser mediados pelo peróxido de hidrogênio altamente reativo gerado no processo de oxidação. Entretanto, algumas vezes o efeito não é somente atribuído ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> liberado, as interações diretas entre a LAAO e a célula-alvo também podem desempenhar funções importantes. Alves e colaboradores (2008) evidenciaram a indução da agregação plaquetária *in vitro* posteriormente à produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> oriunda da ação de uma LAAO isolada do veneno de *Bothrops atrox*. Outras potenciais atividades relacionadas às LAAOs se referem à ação anti-HIV, anticoagulante e anticâncer, tratando-se de proteínas com diferentes funções (Tan e Fung, 2008).

## **2.4. Aplicações farmacológicas**

Conforme apresentado nas seções anteriores, os venenos das serpentes são constituídos por dezenas de proteínas que ativam uma variedade de processos biológicos e incapacitam suas presas ou seus inimigos. Algumas destas moléculas, porém, podem ser usadas em benefício da saúde humana. Nesta seção, serão apresentados dois campos das ciências biológicas onde as ações de proteínas extraídas do veneno de serpentes parecem ter efeitos benéficos.

### **2.4.1. Antimicrobianos**

Os antimicrobianos são substâncias utilizadas na destruição ou inibição do crescimento de populações microbianas. Podem ter origem natural, sintética ou semi-sintética. Os agentes antimicrobianos podem ser classificados com base em sua estrutura química, mecanismo de ação, tipos de microrganismos contra os quais são primariamente ativos, ação (bacteriostática ou bactericida) e origem (produzidos por fungos, bactérias, dentre outros) (Tripathi, 2006).

A descoberta e o desenvolvimento de um novo antimicrobiano são tarefas árduas, pois requerem longos períodos de pesquisas e altos

investimentos por parte do setor farmacêutico. Mais comumente, o que ocorre são modificações estruturais nas moléculas já existentes, sendo a criação de uma nova classe de antibióticos uma situação não corriqueira (Caierão *et al.*, 2004).

Durante as últimas décadas, a disponibilidade de uma grande variedade de antibióticos e seu amplo uso no combate a infecções culminou em aumento progressivo da resistência de linhagens de microrganismos patogênicos a estes compostos. Atualmente, tem-se buscado restringir o uso clínico dos antibióticos devido a esta elevada multirresistência, que pode ser de ordem natural ou adquirida (por meio de mutação ou transferência gênica) (Tripathi, 2006).

Como alternativa a esse paradigma, novas classes de antibióticos, incluindo proteínas ou peptídeos antimicrobianos (PAM) de origem animal, têm sido extensivamente investigadas (Matsuzaki *et al.*, 1997). Nos últimos anos mais de 1000 PAM já foram caracterizados a partir de microrganismos, plantas, vertebrados e invertebrados (Boman, 1995; Bulet *et al.*, 2004; Brogden, 2005).

Os PAM são moléculas do sistema imune inato, presentes na maioria dos seres vivos, que podem apresentar potente atividade antimicrobiana contra um amplo espectro de microrganismos, e, ao mesmo tempo, apresentam baixa ou nenhuma, toxicidade para células animais (Bachère *et al.*, 2000). Nos animais superiores, os sistemas de defesa imunológica do tipo celular e do tipo humoral não são acionados de forma rápida o suficiente para evitar a exposição inicial do organismo aos agentes patogênicos. Os locais onde ocorrem com mais frequência o primeiro encontro com microrganismos são as superfícies epiteliais (pele, olhos, vias aéreas, trato digestório, vias urinárias e reprodutivas). Em mamíferos, por exemplo, estas superfícies secretam uma diversidade de PAM chamados defensinas, que formam uma barreira protetora contra a infecção. As células fagocitárias também contêm em seu citoplasma diversos grânulos repletos de PAM e enzimas digestivas; ainda, alguns tipos de grânulos ricos em PAM têm seus conteúdos secretados para o fluído extracelular onde matam ou impedem o crescimento de microrganismos (Ganz e Lehner, 2001).

O epitélio dos invertebrados, especialmente o trato digestório dos insetos, secreta PAM que são importantes na defesa contra infecção por patógenos. Os artrópodes possuem PAM que podem ser secretados e dissolvidos na hemolinfa após uma infecção, assim como outros PAM produzidos constitutivamente e armazenados em grânulos presentes no interior dos hemócitos. Os hemócitos podem secretar na linfa os PAM armazenados em seu interior em resposta a uma infecção ou utilizá-los internamente para matar microrganismos fagocitados. Nas plantas, os PAM estão presentes especialmente nas sementes, cuja estrutura é vulnerável durante o período de germinação (Ganz e Lehner, 2001).

Os diferentes grupos de PAM isolados até o momento se caracterizam por serem moléculas anfipáticas, que possuem uma região hidrofóbica, que interage com lipídios e uma região hidrofílica carregada positivamente (com alto conteúdo de lisina, arginina e/ou histidina), capaz de interagir com resíduos aniônicos. Muitos PAM são também ricos em resíduos de cisteína, o que favorece a formação de pontes dissulfeto na estrutura molecular, tornando-os resistentes às proteases presentes no plasma (Bulet *et al.*, 2004).

A forma como agem os diversos PAM envolve, em geral, a associação com lipídios da membrana plasmática microbiana provocando aumento de sua permeabilidade (Maget-Diana, 1999; Naghmouchia *et al.*, 2007). Dessa forma, eles podem ser ativos contra bactérias, fungos, protozoários, e até mesmo vírus envelopados (vírus da influenza e HIV, por exemplo) (Hancock e Diamond, 2000). O efeito generalizado destes PAM sobre a membrana dificulta o desenvolvimento de resistência por parte dos patógenos, tendo em vista a improbabilidade da ocorrência de mutações capazes de produzir grandes alterações nos componentes lipídicos da membrana dos microrganismos. Assim, os PAM possuem, em geral, amplo espectro de ação (Andreu e Rivas, 1998; Zasloff, 2002).

Pesquisas recentes têm avaliado os efeitos de moléculas protéicas obtidas de veneno de serpentes sobre o crescimento de microrganismos, especialmente os patogênicos. Exemplo disso é o estudo conduzido por Paiva e colaboradores (2011), o qual revelou a ação de uma LAAO extraída do veneno de serpente *Bothrops atrox* contra diferentes microrganismos. O



efeito bactericida ocorreu contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 29213) e *Escherichia coli* (ATCC 14948) após 30 minutos de tratamento com as doses de 24 e 48 µg da enzima. O efeito parasiticida desta LAAO foi observado contra diferentes espécies de *Leishmania* (*Leishmania braziliensis*, *Leishmania donovani* e *Leishmania major*) e *Trypanosoma cruzi*. A enzima purificada apresentou concentração necessária para produzir metade da resposta máxima (IC<sub>50</sub>) de 23,34 µg/mL contra *L. braziliensis*, 4,3 µg/mL contra *L. donovani* e 4,5 µg/mL *L. major*, já contra *T. cruzi* a IC<sub>50</sub> foi de 62,8 µg/mL, o que mostra maior sensibilidade das espécies de *Leishmania* quando na presença da enzima. Segundo Costa e colaboradores (2008), outras proteínas, como fosfolipases A<sub>2</sub> obtidas de veneno da serpente *Bothrops brazili* e peptídeos sintéticos derivados da região C-terminal destas fosfolipases também possuem efeitos bactericida (contra *Escherichia coli* e *Candida albicans*) e parasiticida (contra *Leishmania sp.*). Desta forma, as propriedades multifuncionais destes PAM podem ser de interesse para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas contra parasitas e bactérias.

#### **2.4.2. Anticarcinogênicos**

A carcinogênese é um processo complexo, de difícil elucidação e que transcorre em múltiplas etapas (Amendola e Vieira, 2005). Comumente, os eventos de replicação do DNA e divisão celular são coordenadamente controlados para atender às necessidades do organismo (Collins *et al.*, 1997). Todavia, alterações nos mecanismos que regulam esses processos podem modificar a fisiologia da célula normal.

Embora existam mecanismos de reparo que removem a maior parte das lesões introduzidas no DNA, uma pequena parcela não chega a ser reparada ou a reparação é ineficiente. Como consequência, surgem as mutações. A transformação neoplásica se inicia quando estas mutações alteram a função de genes (como, por exemplo, proto-oncogenes e genes supressores de tumor) que regulam direta ou indiretamente a proliferação ou a diferenciação celular (Amendola e Vieira, 2005). A replicação contínua das células geneticamente modificadas resulta na formação de uma colônia de células anormais que podem acumular outras mutações para eventualmente iniciar o câncer (Wren, 2007).

Segundo o Instituto do Câncer (Brasil, 2011a, b), nos anos de 2008 e 2009 o câncer de pele melanoma levou ao óbito 1.392 pessoas (827 homens e 565 mulheres); já o número de óbitos provocados pelo câncer de mama foi de 12.098, sendo maior entre as mulheres (11.969 óbitos). Ainda, considerando o cenário epidemiológico brasileiro, para o ano de 2012 as estimativas apontam que poderão ocorrer 6.230 novos casos de câncer de pele melanoma e 52.680 novos casos de câncer de mama.

O melanoma é uma neoplasia maligna dos melanócitos, células pigmentadas especializadas, derivadas da crista neural, predominantemente encontradas na camada basal da epiderme. A função dos melanócitos é produzir e transferir a melanina para queratinócitos mitoticamente ativos, os quais são também encontrados na epiderme. A transferência de melanina é concentrada no espaço perinuclear dos queratinócitos e os protege contra danos provocados pela radiação ultravioleta (Tuong *et al.*, 2012).

A patogênese do melanoma é complexa e não está totalmente elucidada. Como ocorre em outros tipos de câncer, ela envolve interações entre fatores ambientais e o acúmulo de alterações genéticas. Três etapas têm sido propostas para o entendimento da progressão do melanoma: 1) no estágio inicial, o melanoma pode ser confinado a epiderme e o crescimento ocorre somente de forma radial (ou lateral); 2) quando o melanoma progride, ele pode tornar um melanoma microinvasivo, no qual extensões microscópicas invadem a derme papilar superficial e 3) o melanoma mais avançado progride para uma fase de crescimento vertical, que é caracterizada pela invasão profunda da derme. Neste estágio, o melanoma ganha potencial para metastatizar (Tuong *et al.*, 2012). Embora seja frequente a ocorrência de câncer de pele no Brasil (25% de todos os tumores malignos registrados no país), o melanoma representa apenas 4% das neoplasias malignas do órgão, mas é ressaltada a sua gravidade e devido a alta possibilidade de metástase (Brasil, 2011a).

O câncer de mama é segundo tipo mais frequente no mundo e o mais comum entre as mulheres (Brasil, 2011b). A hipótese da história natural da neoplasia da mama se inicia com a hiperproliferação das células ductais (estágio pré-maligno de hiperplasia ductal atípica), evolui para a neoplasia *in situ* (estágio pré-invasivo do carcinoma ductal *in situ*), progride para um

estágio potencialmente invasivo e letal (carcinoma ductal invasivo) e, finalmente, para a doença metastática (Ma *et al.*, 2003; Polyak, 2007).

Em todo o mundo são muitas as tentativas de desenvolvimento de drogas anticâncer obtidas de fontes naturais. A biodiversidade dos venenos faz deles fontes únicas de compostos bioativos e de modelos estruturais, a partir dos quais novos agentes terapêuticos podem ser desenvolvidos. Venenos de diferentes espécies animais (serpentes, escorpiões, sapo, dentre outros) e seus componentes ativos, principalmente proteínas e peptídeos, têm mostrado potencial terapêutico contra o câncer (Gomes *et al.*, 2010). Os achados de alguns estudos que avaliaram a ação de proteínas ou peptídeos extraídos de veneno de serpentes contra o câncer de pele, principalmente o melanoma (devido à sua agressividade) e o câncer de mama (devido à sua alta incidência) são destacados.

Estudo conduzido por Costa e colaboradores (2008) revelou o efeito citotóxico de fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas de veneno de serpente *Bothrops brazili* sobre linhagem de leucemia de célula T humana (Jurkat) administradas em diferentes concentrações (10, 50 e 100 µg/mL). Efeito antitumoral também foi citado por Kerkis e colaboradores (2010) em relação à crotamina, um polipeptídeo básico de baixo peso molecular extraído do veneno de uma cascavel da América do Sul. A crotamina tem também a habilidade de penetrar na célula e acumular no núcleo, servindo como marcador do tráfego intracelular de vesículas e da distribuição do DNA em células em divisão. Desta forma, a crotamina além o efeito anticarcinogênico, tem potencial uso como sonda para detectar as células que se encontram em processo mitótico. O mecanismo de ação de alguns peptídeos parece ser por meio do bloqueio de canais iônicos presentes na membrana plasmática (por exemplo, os canais Kv11.1 (hERG1) expressos de forma aberrante em vários cânceres humanos, que controlam diferentes aspectos do comportamento neoplásico), impedindo o crescimento de alguns tumores (Arcangeli e Becchetti, 2010; Beraud e Chandy, 2011).

Outro tipo de proteína, uma LAAO extraída de veneno de serpente *Bothrops atrox* também mostrou atividade citotóxica contra as linhagens celulares HL60 (leucemia), Jurkat, B16F10 (melanoma) e PC12 (tumor neuro-endócrino). Neste trabalho foi revelado que a citotoxicidade foi inibida

pela catalase, então o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido parece exercer importante papel na morte celular. Adicionalmente, a microscopia de fluorescência revelou aumento da apoptose após o tratamento com BatroxLAAO, confirmada pela ativação das caspases (Alves *et al.*, 2008). Pesquisa realizada por Paiva e colaboradores (2011) revelou que o tratamento com uma BatroxLAAO além de induzir a apoptose em células HL-60, levou ao acúmulo das células na fase G0/G1 do ciclo celular, quando administrados 25 e 50 µg/mL, resultando na paralisação das células nesta fase.

Poucos são os estudos que avaliam a ação de venenos de serpentes sobre o desenvolvimento do câncer de mama, todavia os resultados já encontrados são animadores. El-Refael e Sarkar (2009) avaliaram o potencial antitumoral do veneno de *Cerastes cerastes*, uma serpente do deserto Egípcio, sobre a linhagem celular RIII/Sa-MT (tumor mamário induzido por vírus). Os autores encontraram que a concentração de 7 µg/mL do veneno matou aproximadamente 55% das células no ensaio *in vitro*, após um período de 48 horas. O ensaio conduzido *in vivo*, quando a linhagem celular foi transplantada para camundongos singênicos e aos animais administrado 1 µg do veneno/animal/1vez por semana, durante 4 semanas, apontou uma redução de 54% do tumor e uma maior sobrevivência dos animais tratados (35 dias). A necrose foi relatada pelos autores como o mecanismo por meio do qual a morte celular é induzida. É importante ressaltar que resultados de estudos como este precisam ser avaliados com cautela. Isto porque, como se trata do veneno bruto, muitas são as substâncias que podem atuar sobre as células cancerosas, não sendo possível avaliar se um ou mais compostos são responsáveis pelos resultados encontrados.

Outros componentes de venenos de serpentes parecem ter efeitos diversos, isto pode ser exemplificado pela ação da cardiotoxina III, um polipeptídeo básico isolado do veneno de *Naja naja atra*. Ao tratar a linhagem de células MCF-7 (câncer de mama) com este peptídeo, Chiu e colaboradores (2009) verificaram indução da apoptose a qual foi confirmada pela externalização da fosfatidilserina e clivagem da polimerase poli ADP-ribose com uma IC<sub>50</sub> de 2 µg/mL após 48 horas. Adicionalmente, o tratamento com a cardiotoxina III também causou a superexpressão de Bax (pró-apoptótica), inibiu a expressão de Bcl-2 (anti-apoptótica), promoveu a

liberação do citocromo C mitocondrial para o citosol, o que conduziu a uma subsequente ativação da caspase 9, além de ter reduzido a expressão de NF- $\kappa$ B. Os autores sugerem que além de suprimir a proliferação, a cardiotoxina III ocasionou a morte celular das células MCF-7 por apoptose.

Diante destes resultados, os compostos ativos presentes nos venenos de serpentes são potenciais biofármacos, seja contra infecções causadas por microrganismos, seja como terapias promissoras contra diferentes tipos de câncer e, portanto, devem merecer considerável atenção.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1. Objetivo Geral:**

Caracterizar bioquimicamente a enzima L-aminoácido oxidase isolada do veneno bruto de *Bothrops jararacussu* e avaliar seu potencial antibacteriano e antitumoral.

#### **3.2. Objetivos Específicos:**

- a) Purificar uma L-aminoácido oxidase (LAAO) de *B. jararacussu*,
- b) Caracterizar a enzima bioquimicamente pela determinação da massa molecular, especificidade enzimática, perfil de peptídeos trípticos e sequência N-terminal,
- c) Avaliar a atividade antimicrobiana, determinar a concentração inibitória mínima e concentração bactericida mínima contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas,
- d) Avaliar o potencial antitumoral contra as linhagens celulares B16F10 - (melanoma murino) e MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama humano), e
- e) Avaliar o efeito citotóxico sobre eritrócitos humanos.

## 4. MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1. MATERIAL BIOLÓGICO

O veneno bruto de *Bothrops jararacussu* foi obtido a partir de cobras capturadas na região de Viçosa, MG, pertencentes ao serpentário do Museu de Zoologia João Moojen da Universidade Federal de Viçosa. Após a coleta, as amostras de veneno foram armazenadas a -20°C até o momento das análises.

As cepas bacterianas foram gentilmente cedidas pela Professora Maria Cristina Dantas Vanetti, coordenadora do Laboratório de Microbiologia de Alimentos da Universidade Federal de Viçosa. As cepas utilizadas no presente estudo foram:

a) Bactérias Gram-positivas: *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644), *Bacillus cereus* (ATCC14579), *Bacillus subtilis* (ATCC 23858).

b) Bactérias Gram-negativas: *Enterobacter sakazakii* (ATCC 29004), *Escherichia coli* (ATCC 29214), *Moraxella catarrhalis* (ATCC 25238), *Proteus vulgaris* (ATCC 13315), *Shigella flexneri* (ATCC 12022), *Citrobacter freundii* (ATCC 8090), *Salmonella typhimurium* (ATCC 14028).

Os eritrócitos humanos do tipo O, Rh+ foram fornecidos pela Divisão de Saúde da Universidade Federal de Viçosa, provenientes de doadores saudáveis.

As células tumorais foram provenientes de estoques contidos no laboratório de Imunovirologia Molecular e Glicoimunologia da Universidade Federal de Viçosa, onde as análises deste estudo foram conduzidas. Culturas de células B16F10 (melanoma murino) e MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama humano) foram empregadas neste trabalho.

### 4.2. PURIFICAÇÃO DA L-AMINOÁCIDO OXIDASE DE *Bothrops jararacussu*

#### 4.2.1. Cromatografia de afinidade em *Sepharose-Con A*

O veneno bruto de *B. jararacussu* foi parcialmente purificado através de cromatografia de afinidade a lectina usando concanavalina A (Con A)

imobilizada em gel de *Sepharose*. Alíquotas de 300  $\mu$ L do veneno foram dissolvidas em Tris-HCl 20 mM contendo NaCl 0,5 M pH 7,4 (tampão A) e submetidas a cromatografia de afinidade em coluna de *Sepharose-Con A* em um fluxo constante de 0,5 mL/minuto. As glicoproteínas foram eluidas no tampão A acrescido de manose 0,5 M (tampão B). A detecção foi por meio da leitura da absorbância a 280 nm em sistema FPLC (*Fast Protein Liquid Chromatography*).

#### **4.2.2. Cromatografia de troca iônica**

A fração de glicoproteínas obtida foi submetida à cromatografia de troca iônica em coluna MonoQ HR 5/5 equilibrada com tampão Tris-HCl 20mM pH 7,4 (tampão A) e eluida em gradiente linear de 0 a 30% de tampão A acrescido de NaCl 1M (tampão B). Alíquotas de 2 mL da amostra foram separadas em um fluxo constante de 1mL/minuto. Frações de 0,5 mL foram coletadas em tubos de ensaio e a detecção foi pela leitura da absorbância a 280 nm em sistema FPLC. Todas as frações coletadas foram testadas quanto à atividade antimicrobiana, como descrito no item 4.4.1.1., e o grau de pureza para cada fração foi analisado por SDS-PAGE corado por prata. As frações contendo atividade antimicrobiana e com grau de pureza semelhante foram reunidas e novamente aplicadas na coluna para se obter a proteína pura. Nesta etapa de purificação, a coluna foi equilibrada com 10% de tampão B e eluida em gradiente linear de 10 a 25% de tampão B.

#### **4.2.3. Determinação da concentração protéica**

Para determinar a concentração de proteína total do veneno bruto e de cada fração obtida nas etapas de purificação foi utilizado o método do ácido bicinonínico (BCA), usando como padrão uma curva de soro albumina bovina (BSA) com concentrações variando de 0 a 1000  $\mu$ g/mL. O reagente utilizado foi preparado adicionando-se sulfato de cobre ao reagente BCA na proporção de 1:50. Em cada poço de uma microplaca de 96 poços foram adicionados 10  $\mu$ L da amostra a ser quantificada e 200  $\mu$ L do reagente preparado. A microplaca foi incubada a 37°C por 30 minutos e a absorbância foi medida a 562 nm em uma leitora de microplacas BioRad (Modelo 3550-



UV, Hercules, CA, USA). Esses dados foram utilizados para a determinação da concentração protéica.

### **4.3. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA**

#### **4.3.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida em presença de SDS (SDS-PAGE)**

O grau de pureza e a massa molecular da proteína purificada foram estimados por eletroforese em gel de poliacrilamida a 10% em presença de SDS, de acordo com a metodologia descrita por Laemmli (1970). Para tanto, as amostras foram ressuspendidas em tampão de amostra redutor 4x (Tris-HCl 1 M pH 6,8; glicerol 30%; SDS 9,2%; azul de bromofenol 1%,  $\beta$ -mercaptoetanol 20%), ou em tampão de amostra não redutor 4x (Tris-HCl 1 M pH 6,8; glicerol 30%; SDS 9,2%; azul de bromofenol 1%), sendo incubadas a 100°C por 5 minutos. As amostras e o marcador de peso molecular foram aplicados em gel de poliacrilamida e a eletroforese conduzida em tampão de corrida (Tris 25 mM; glicina 0,192 M; SDS 0,1%; pH 8,3), sendo submetida uma voltagem constante de 170 V por, aproximadamente, 1 hora. O marcador de massa molecular utilizado foi *Page Ruler Prestained Protein Ladder (Thermo Scientific)*. Após a corrida, o gel foi corado tanto pela técnica de coloração por prata, quanto utilizando *Coomassie Brilliant Blue G-250 2%*.

#### **4.3.2. Perfil de peptídeos trípticos**

##### **4.3.2.1. Digestão tríptica da proteína**

A banda recortada do SDS-PAGE corada com *Coomassie Brilliant Blue G-250 2%* foi fragmentada em pedaços de 1 mm<sup>2</sup>, transferida para microtubo de 1,5 mL e lavada sucessivamente com 200  $\mu$ L de acetonitrila (ACN) 50% em bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub>) 25 mM pH 8,0, para remover o corante e o SDS. A banda descorada foi adicionado 100  $\mu$ L de tampão redutor (ditiotretol (DTT) 65mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100mM) por 30 minutos a 56°C e, subsequentemente, 100  $\mu$ L de tampão de alquilação (iodoacetamida 200mM em NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 100mM) por 30 minutos à temperatura

ambiente no escuro. Os fragmentos de gel foram lavados duas vezes com 200  $\mu\text{L}$  de ACN 50% em  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM e uma vez com ACN 100% e posteriormente secos em Speed-Vac (Eppendorf). Os fragmentos de gel foram reidratados no gelo por 15 minutos, em 30  $\mu\text{L}$  de solução de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  25 mM/ $\text{CaCl}_2$  2,5 mM contendo 0,75  $\mu\text{g}$  de tripsina grau seqüenciamento modificada (Promega). A digestão foi realizada a 37°C por 20 h. Os peptídeos trípticos foram extraídos com 30  $\mu\text{L}$  de ácido fórmico 5%/ACN 50%, e o volume final foi reduzido para 10  $\mu\text{L}$  em Speed-Vac.

#### **4.3.2.2. Espectrometria de massa**

A mistura de peptídeos da digestão tríptica foi misturada na proporção de 1:9 com uma solução de matriz reconstituída de ácido  $\alpha$ -ciano-4-hidroxicinâmico em ACN 50%/ TFA 0,1% em água. Alíquotas de 0,7  $\mu\text{L}$  da mistura foram aplicadas na placa para MALDI (*Matrix-assisted laser desorption/ionization*) e seco à temperatura ambiente antes da análise no espectrômetro de massa.

Os espectros de massa foram obtidos usando-se o equipamento MALDI TOF/TOF UltraFlexIII (Bruker Daltonics). Os mapas de peptídeos foram adquiridos no modo refletor e os espectros foram calibrados externamente com mistura de peptídeos padrões. O padrão de fragmentação obtido foi analisado em banco de dados.

#### **4.3.2.3. Pesquisa no banco de dados**

As massas monoisotópicas de cada peptídeo oriundo do MALDI TOF foram submetidas à busca no Mascot ([www.matrixscience.com](http://www.matrixscience.com)), programa publicamente disponível que permite a identificação por mapa de peptídeos (PMF). Os critérios de busca foram todas as massas moleculares e pontos isoelétricos, cisteínas modificadas por carboxamidometilação e as modificações possíveis, a saber: oxidação de metionina, fosforilação, cisteínas modificadas por acrilamida. Os dados obtidos nos espectros foram filtrados pela relação sinal/ruído dos picos de 20 para os dados de MS.

### **4.3.3. Determinação da sequência N-terminal**

Para sequenciar a porção N-terminal da proteína, uma alíquota de 15 µL da enzima pura foi adicionada em disco de fibra de vidro e submetida à análise por degradação de Edman usando um sequenciador PPSQ 33A (Shimadzu). A sequência N-terminal obtida foi comparada ao banco de dados de proteína do site NCBI usando o programa BLAST (<http://blast.ncbi.nlm.nih.gov>).

### **4.3.4. Ensaio de atividade para LAAO e especificidade enzimática**

Para determinação da atividade de L-aminoácido oxidase da fração purificada, foi realizado um ensaio em microplaca de 96 poços. Uma alíquota de 10 µL da enzima numa concentração de 30 µg/mL foi incubada com 90 µL de uma solução que continha L-leucina 25 mM, o-fenilenediamina (OPD) 40 µM e peroxidase 0,04 U/mL em Tris-HCl 0,1 M pH 8,0, totalizando em 100 µL/poço. A placa foi mantida a 37°C, e após 60 minutos, a reação foi paralisada pela adição de 50 µL de H<sub>2</sub>SO<sub>4</sub> 2 M. A atividade enzimática foi determinada pela leitura da absorbância a 490 nm, utilizando como padrão uma curva de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) com concentrações variando entre 0 e 1000 µM. Para determinar a especificidade enzimática, o ensaio acima descrito foi realizado utilizando os seguintes substratos: L-leucina, L-alanina, L-valina, L-iso-leucina, L-metionina, L-prolina, L-cisteína, L-treonina, L-serina, L-ácido glutâmico, L-ácido aspártico, L-glutamina, L-asparagina, L-tirosina, L-fenilalanina, L-triptofano, L-lisina, L-arginina, L-histidina. Os experimentos foram realizados em triplicata. Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a produção de 1µM de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto de reação.

## **4.4. ENSAIOS BIOLÓGICOS**

### **4.4.1. Avaliação da atividade antimicrobiana**

#### **4.4.1.1. Ensaio preliminar**

Para verificar a presença de frações ativas contra microrganismos, foi realizado um ensaio antimicrobiano inicial, através de teste de difusão em

ágar, contra a bactéria patogênica Gram-positiva *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591). Colônias de *S. aureus* foram crescidas em meio Luria Bertani (LB) líquido a 37°C *overnight* e uma alíquota dessa suspensão foi diluída no mesmo meio de cultura na proporção de 1:50. Alíquotas de 1 mL dessa nova suspensão foram adicionadas a 15 mL de meio Mueller Hinton fundido ( $\pm$  45°C). Essa mistura foi vertida em uma placa de Petri e homogeneizada. Em poços de 3 mm feitos no meio solidificado foram adicionadas alíquotas de 10  $\mu$ L das frações obtidas pelos processos de purificação. A placa foi incubada a 37°C por 24 h. A atividade antimicrobiana foi avaliada pela observação da inibição do crescimento da bactéria por meio de halos formados na placa.

#### **4.4.1.2. Determinação da concentração inibitória mínima**

Para a fração purificada com atividade antimicrobiana foi determinada a concentração inibitória mínima (CIM), ou seja, a menor concentração onde nenhum crescimento foi detectado por meio de leitura espectrofotométrica. Os ensaios foram realizados de acordo com as normas do CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute). Alíquotas de 25  $\mu$ L de diluições seriadas da proteína pura, feitas a partir de uma solução estoque de 400  $\mu$ g/mL, foram incubadas com 100  $\mu$ L de suspensão bacteriana diluída em meio de cultura LB na proporção de 1:50. O controle para ausência do crescimento foi a gentamicina diluída serialmente, a partir de uma solução estoque de 500  $\mu$ g/mL. O controle para crescimento pleno foi NaCl 0,9% estéril. Após a incubação por um período de 22 h a 37°C, as placas foram analisadas a 600 nm em leitora de microplacas BioRad (Modelo 3550-UV, Hercules). Os ensaios foram realizados em triplicatas.

#### **4.4.1.3. Determinação da concentração bactericida mínima**

Para determinar a concentração bactericida mínima (CBM), uma alíquota de 25  $\mu$ L dos poços que não apresentaram crescimento foi transferida para poços de outra microplaca contendo 100  $\mu$ L de LB estéril. Os controles também foram reinoculados. A microplaca foi incubada em estufa a 37°C durante 22 h. A menor diluição onde não houve crescimento foi considerada como a CBM.

#### **4.4.1.4. Análise do potencial bactericida**

Linhagens referenciais de bactérias, descritas em item 4.1, foram cultivadas em 5 mL de meio LB líquido sob agitação a 37°C *overnight*. As suspensões de bactérias, em fase logarítmica, foram diluídas no mesmo meio de cultura na proporção de 1:50, e uma alíquota de 100 µL de suspensão de cada cultura bacteriana foi incubada por 22 h a 37°C com 25 µL de diferentes concentrações da fração purificada. Os controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram, respectivamente, gentamicina 1mg/mL e NaCl 0,9% estéril, ambos incubados com as suspensões bacterianas. A inibição do crescimento foi determinada pela leitura da densidade óptica a 600 nm em uma leitora de microplacas. Para todas as bactérias analisadas foram determinadas a CIM e a CBM.

#### **4.4.2. Efeito citotóxico sobre células tumorais**

##### **4.4.2.1. Cultura de células tumorais**

As linhagens celulares B16F10 (melanoma murino) e MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama humano) foram mantidas em meio DMEN adicionado de 10% de soro fetal bovino, 100 U/mL de penicilina, e 100 µg/mL de estreptomicina, incubadas a 37°C em atmosfera úmida com 5% de CO<sub>2</sub>.

##### **4.4.2.2. Análise da viabilidade celular**

A viabilidade celular foi determinada pelo teste de redução do brometo de 3(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazólio (MTT), que avalia a integridade mitocondrial das células testadas baseado na redução enzimática deste composto a formazan pelas desidrogenases mitocondriais. As células cancerosas B16F10 e MDA-MB231 foram aliqüotadas ( $1 \times 10^4$  células/mL) em microplacas de cultivo de 96 poços com fundo chato e incubadas por um período de 24 horas em meio DMEN completo. Posteriormente, foram adicionadas concentrações da enzima que variaram de 0,1 a 10 µg/mL. Após 48 horas, o sobrenadante foi removido e foram adicionados 100 µL de uma solução de MTT (0,5 mg/mL). Após 4 horas de incubação a 37°C, o

meio de cultura foi aspirado e foram adicionados 100 µL de dimetilssulfóxido (DMSO). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle de 100% de viabilidade celular, e como controle de morte celular (0% de viabilidade) foram utilizadas as culturas tratadas com Triton-X 100 1%. A absorbância foi monitorada a 550 nm em uma leitora de microplacas.

#### **4.4.3. Efeito citotóxico sobre eritrócitos**

Eritrócitos de sangue humano tipo O, Rh<sup>+</sup> foram separados do plasma por sedimentação e lavados três vezes com NaCl 0,9%. Utilizou-se a mesma solução para diluir a enzima e preparar uma solução 2% (v/v) de eritrócitos. Alíquotas de 100 µL da enzima nas concentrações de 0,1; 1; 5 e 10 µg/mL foram incubadas por 24 horas à temperatura ambiente com 100 µL da suspensão de eritrócitos. Após esse período, os tubos foram centrifugados a 3000 x g por 5 minutos. Uma alíquota de 50 µL de cada sobrenadante foi transferida para uma microplaca de 96 poços de fundo chato e a leitura da absorbância realizada a 540 nm. Para as amostras de referência foram utilizados Triton X-100 1% (v/v) como referência de 100% de lise e NaCl 0,9 % como referência de 0% de hemólise.

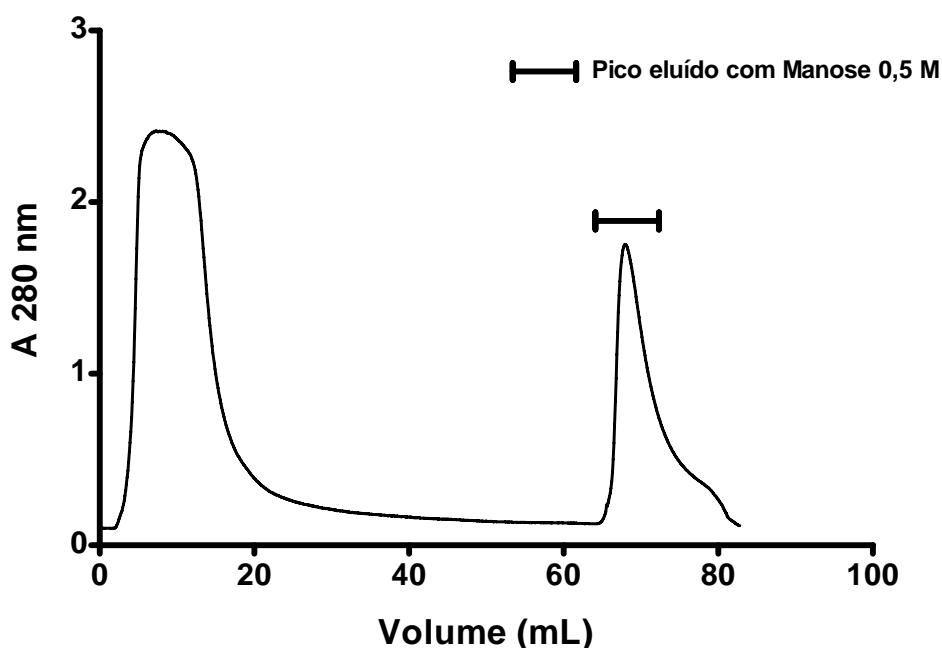
#### **4.5. ANÁLISE ESTATÍSTICA**

A determinação estatística das diferenças entre as médias dos grupos experimentais foi realizada por análise de variância (ANOVA), seguido pelo pós-teste de comparação múltipla de Tukey. Diferenças com  $p < 0,05$  foram consideradas estatisticamente significativas. Todos os experimentos foram realizados pelo menos três vezes.

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

### 5.1. ISOLAMENTO DA LAO DE *B. jararacussu*

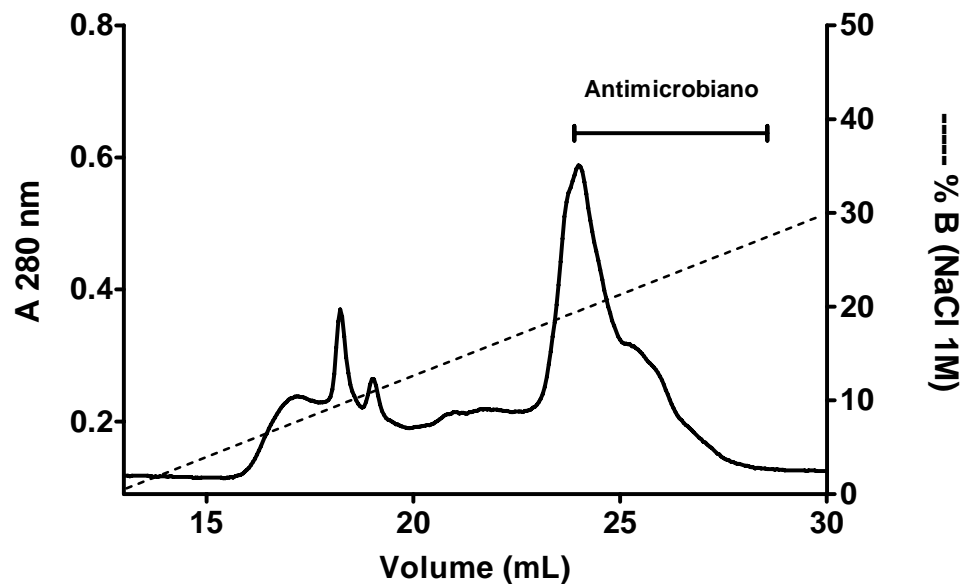
A LAO de *B. jararacussu* foi isolada em três etapas de purificação. O primeiro processo cromatográfico realizado foi por afinidade a concanavalina A (ConA), uma lectina que se liga com especificidade a grupos como  $\alpha$ -D-manosil e  $\alpha$ -D-glicosil, encontrados em vários carboidratos, glicoproteínas e glicolípídeos. Assim, diferentes formas de proteínas glicosiladas foram separadas de outros componentes presentes no veneno bruto de *B. jararacussu*. O pico eluído em presença de manose 0,5 M (Figura 2) foi concentrado em sistema de ultrafiltração (AMICON) em membrana de 10.000 Da a 3500 rpm.



**Figura 2.** Perfil cromatográfico do veneno bruto de *B. jararacussu* obtido por cromatografia de afinidade a concanavalina A. O veneno bruto foi dissolvido em Tris-HCl 20 mM contendo NaCl 0,5 M pH 7,4 e eluído no mesmo tampão acrescido de manose 0,5 M em fluxo constante de 0,5 mL/minuto. A detecção foi feita pela leitura de absorvância a 280 nm em sistema FPLC.

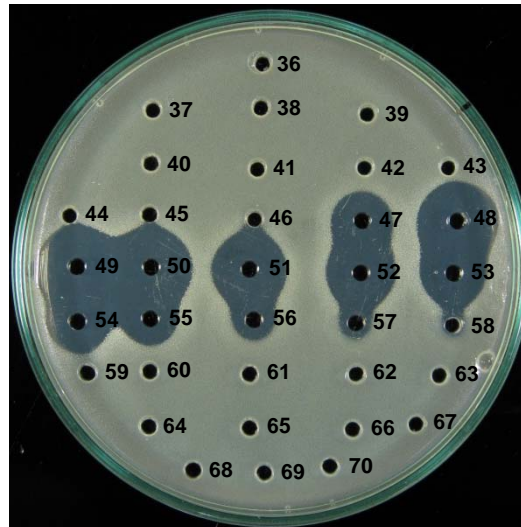
A fração obtida foi submetida à cromatografia de troca aniônica em coluna MonoQ HR 5/5, que possui grupos amônio quaternário ligados a resina.

Vários picos de proteína foram obtidos (Figura 3) e todas as frações coletadas foram testadas quanto à atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (Figura 4). O grau de pureza para cada fração foi analisado por SDS-PAGE após revelação por prata (Figura 5).

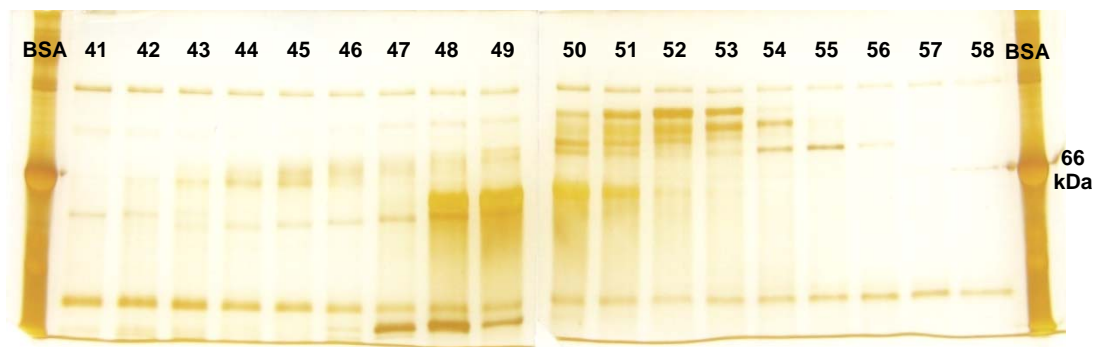


**Figura 3.** Cromatografia de troca iônica da fração de glicoproteínas em coluna MonoQ equilibrada com Tris-HCl 20 mM pH 7,4 (tampão A) e eluída em gradiente linear de 0 a 30% de tampão A acrescido de NaCl 1 M (tampão B) em fluxo constante de 1 mL/minuto. Frações de 0,5 mL foram coletadas em tubos de ensaio e a detecção foi feita pela leitura da absorbância a 280 nm em sistema FPLC. As frações que continham atividade antimicrobiana foram assinaladas no gráfico.





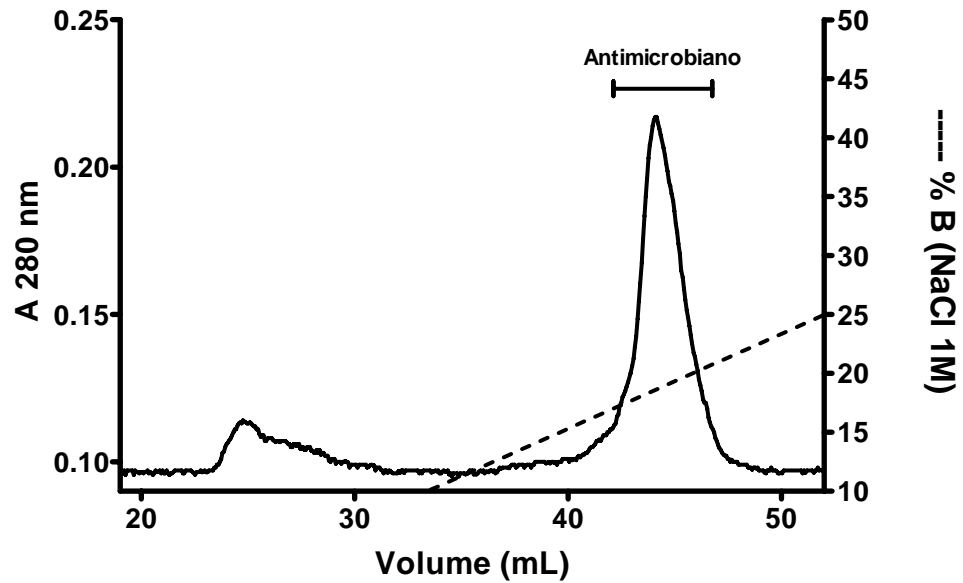
**Figura 4.** Atividade antimicrobiana das frações obtidas contra *S. aureus* através de ensaio de difusão em ágar. As frações contidas nos tubos 47 a 57 apresentaram atividade antimicrobiana.



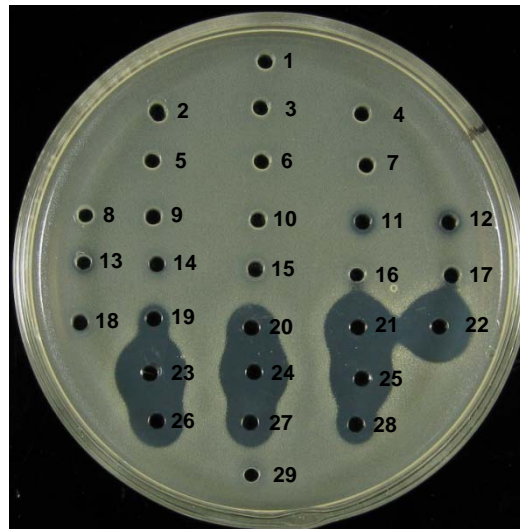
**Figura 5.** Perfil protéico das frações contidas nos tubos 41 a 58 submetidas à SDS-PAGE após revelação por prata. BSA: soro albumina bovina.

As frações contidas nos tubos 54, 55 e 56, por apresentarem atividade antimicrobiana e menor grau de contaminação protéica, foram agrupadas e esta nova fração foi designada MQ1.

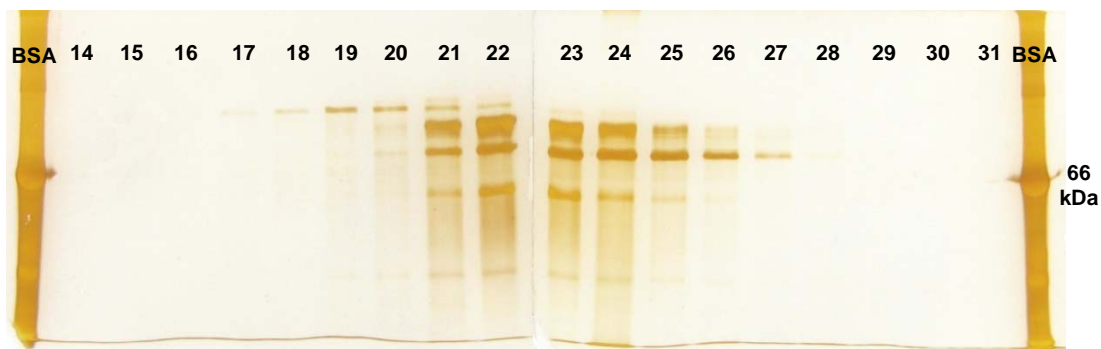
A fração MQ1 foi, então, submetida à recromatografia de troca iônica em coluna MonoQ (Figura 6), com o intuito de obter a proteína pura. Todas as frações obtidas foram testadas quanto à atividade antimicrobiana contra *S. aureus* (Figura 7) e o grau de pureza para cada fração foi analisado por SDS-PAGE após revelação por prata (Figura 8).



**Figura 6.** Cromatografia de troca iônica da fração MQ1 em coluna MonoQ equilibrada com 10% de tampão B e eluída em gradiente linear de 10 a 25% de tampão B em fluxo constante de 1 mL/minuto. Frações de 0,5 mL foram coletadas em tubos de ensaio e a detecção foi pela leitura da absorbância a 280 nm em sistema FPLC. As frações que continham atividade antimicrobiana foram assinaladas no gráfico.



**Figura 7.** Atividade antimicrobiana das frações obtidas contra *S. aureus* através de ensaio de difusão em ágar. As frações contidas nos tubos 19 a 28 apresentaram atividade antimicrobiana.



**Figura 8.** Perfil protéico das frações contidas nos tubos 14 a 31 submetidas à SDS-PAGE após revelação por prata. BSA: soro albumina bovina.

A proteína foi isolada nas frações contidas nos tubos 27 e 28, que apresentaram atividade antimicrobiana e elevado grau de pureza. Estas frações foram reunidas, concentradas e utilizadas para caracterizar e avaliar o potencial antimicrobiano da proteína isolada.

Todas as etapas de purificação foram monitoradas quanto à concentração protéica (Tabela 1), sendo que para obter a proteína isolada, o veneno bruto foi purificado aproximadamente 1044 vezes.

**Tabela 1.** Dados da purificação mostrando as frações obtidas em cada etapa de purificação

Amostras	Volume (mL)	Proteína (mg/mL)	Proteína (mg)	Fator de Purificação	Recuperação (%)
Veneno Bruto	1	426	426	1	100
ConA	15	3,31	49,65	8,58	11,65
MQ1	25	0,028	0,700	608,57	0,164
MQ2	12	0,034	0,408	1044,12	0,096

## 5.2. CARACTERIZAÇÃO BIOQUÍMICA

### 5.2.1. Estimativa da massa molecular por SDS-PAGE

Para estimar a massa molecular foi realizada a análise eletroforética da proteína purificada em gel de poliacrilamida a 10% em presença de SDS e em ausência de  $\beta$ -mercaptoetanol (Figura 9). A massa molecular estimada da LAAO foi de aproximadamente 68 kDa. Segundo Correa-Netto e colaboradores (2010), que realizaram um estudo de proteômica do veneno de *B. jararacussu*, 7 proteínas foram identificadas como LAAO, quando analisadas em SDS-PAGE sob condições redutoras e não redutoras, e suas massas moleculares variaram entre 47 e 78 kDa.



**Figura 9.** SDS-PAGE após coloração por prata apresentando as bandas do marcador molecular e da proteína purificada.

### 5.2.2. Perfil de peptídeos trípticos

A banda de proteína obtida no SDS-PAGE foi submetida à digestão por tripsina para análise do perfil de peptídeos trípticos. A mistura de peptídeos obtidos foi analisada no espectrômetro de massa e as massas monoisotópicas de cada peptídeo oriundo do MALDI-TOF foram submetidas à busca no Mascot.

A análise no Mascot revelou homologia dos peptídeos trípticos da LAAO isolada com os da LAAO já descrita de *B. jararacussu* (BjussuLAAO-I), obtendo uma cobertura de 42% (Figura 10).

**1 MNVFFMFSKP GKLADDRNPL EECFRET DYE EFLEIAKNGL STTSNPKRVV**  
**51 IVGAGMSGLS AAYVLANAGH QVTVLEASER AGGQVKTYRN EKEGWYANLG**  
**101 PMRLPEKHRI VREYIRKFGI QLNEFSQENE NAWYFIKNIR KRVGEVNKDP**  
**151 GVL DYPVKPS EVGKSAGQLY EESLQKAVEE LRRTNCSYML NKYDTYSTKE**  
**201 YLLKEGNLSP GAVDMIGDLL NEDSGYYVSF IESLKHDDIF AYEKRFDEIV**  
**251 GGMDKLPTSM YQAIQEKVHL NARVIKIQQD VKEVTVTYQT SEKETLSVTA**  
**301 DYVIVCTTSR AARRIKFEPP LPPKKAHALR SVHYRSGTKI FLTCTKKFEW**  
**351 DDGIHGKST TDLPSRFIYY PNHNFPNGVG VIIAYGIGDD ANYFEALDFE**  
**401 DCGDIVINDL SLIHQLPKEE IQAICRPSMI QRWSLDKYAM GGITTFPTYQ**  
**451 FQHFSEALTA PVDR IYFAGE YTAQAHGWIA STIKSGPEGL DVNRASE**

**Figura 10.** Sequência de aminoácidos constituintes da BjussuLAAO-I. Em vermelho estão os peptídeos homólogos a LAAO isolada neste trabalho. Os dados foram obtidos pela busca do perfil de peptídeos triptico da LAAO purificada com o emprego da ferramenta Mascot. Os peptídeos obtidos representam 42% da sequência total da BjussuLAAO-I.

### 5.2.3. Análise da sequência N-terminal

Com o intuito de detalhar ainda mais a LAAO isolada neste estudo, foi conduzida a análise da sua sequência N-terminal. A sequência de aminoácidos N-terminal foi obtida por meio da degradação automática de Edman e os 19 primeiros resíduos de aminoácidos foram: ATNRNPLYYQFRRTDYFIF. A pesquisa no banco de dados de sequência de proteína usando o programa BLASTP revelou que a sequência tem similaridade com LAAOs isoladas de outros venenos de serpentes do gênero *Bothrops* e apresenta 56% de identidade com a BjussuLAAO-I (Tabela 3).

O estudo de proteômica de Correa-Netto e colaboradores (2010) relatou a existência de mais de uma LAAO no veneno de *B. jararacussu*. Corroborando com este achado, como as análises de sequenciamento realizada no presente trabalho revelaram homologia, mas baixo grau de similaridade de sequência, pode se tratar de uma nova LAAO isolada de *B. jararacussu*. Para a confirmação desta hipótese será necessário realizar uma caracterização bioquímica mais aprofundada, como a obtenção da massa molecular da proteína íntegra, o perfil de glicosilação e a massa molecular da proteína deglicosilada, determinação do pI e caracterização dos parâmetros enzimáticos (pH, temperatura,  $K_M$  e  $V_{max}$ ), dentre outros.

**Tabela 2.** Alinhamento da região N-terminal da LAAO caracterizada neste trabalho com LAAOs isoladas de outros venenos de serpentes

	<b>Sequência</b>	<b>Número de acesso NCBI</b>	<b>Identidade (%)</b>
LAAO	<b>ATNRNPLYYYQFRRTDYFIF</b>	-	-
Balt-LAAO-I	<b>ADVRNPLEE--FRET DYEV L</b>	P0DI86.1	69
Boleu-LAAO	<b>ADDRNPLEE C FRET DYEE F</b>	P0DI89.1	56
BmoolAAO-I	<b>ADDRNPLEE C FRET DYEE F</b>	Q6TGQ8.1	56
BjussuLAAO-I	<b>ADDRNPLEE C FRET DYEE F</b>	Q6TGQ9.1	56

Os resíduos conservados estão em negrito. Balt-LAAO-I: LAAO-I de *Bothrops alternatus*; Boleu-LAAO: LAAO de *Bothrops leucurus*; BmoolAAO-I: LAAO-I de *Bothrops moojeni*; BjussuLAAO-I: LAAO-I de *Bothrops jararacussu*

#### 5.2.4. Especificidade enzimática

A atividade da LAAO foi determinada utilizando uma peroxidase conjugada. Neste ensaio, o peróxido de hidrogênio gerado pela desaminação oxidativa do L-aminoácido é utilizado pela peroxidase para oxidar a o-fenilenediamina. O produto final da reação é detectado no comprimento de onda de 490 nm. Este ensaio foi realizado utilizando diferentes L-aminoácidos (Tabela 2), sendo que a maior atividade obtida foi quando empregada L-fenilalanina como substrato, seguida por L-metionina e L-arginina. Resultados semelhantes foram encontrados por Stábeli e colaboradores (2004) ao analisarem a atividade da LAAO do veneno *Bothrops alternatus*, a Balt-LAAO-I, que apresentou especificidade por L-fenilalanina, seguida por L-tirosina e L-metionina. A Bpir-LAAO-I, LAAO isolada de *Bothrops pirajai*, também mostrou especificidade por L-fenilalanina, seguida por L-tirosina e L-triptofano (Izidoro *et. al.*, 2006).

**Tabela 3.** Atividade específica da LAAO isolada de *B. jararacussu* em relação aos diferentes L-aminoácidos

<b>Aminoácido</b>	<b>Atividade (U)<sup>a</sup></b>	<b>Atividade específica (U/mg)</b>
L-Fenilalanina	7,040	23468
L-Metionina	5,695	18983
L-Arginina	5,522	18408
L-Glutamina	3,418	11394
L-Lisina	3,142	10474
L-Histidina	3,073	10244
L-Isoleucina	2,832	9439
L-Asparagina	2,590	8634
L-Alanina	2,487	8289
L-Valina	2,211	7369
L-Prolina	1,866	6219
L-Serina	1,831	6104
L-Treonina	1,555	5184
L-Leucina	1,141	3804
L-Triptofano	0,796	2654
L-Cisteína	0,555	1849
L-Tirosina	0,555	1849
L-Ácido Glutâmico	0,486	1619
L-Ácido Aspártico	0,313	1044

<sup>a</sup> Uma unidade de atividade enzimática (U) foi definida como a produção de 1 $\mu$ M de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por minuto de reação.

### 5.3. ENSAIOS BIOLÓGICOS

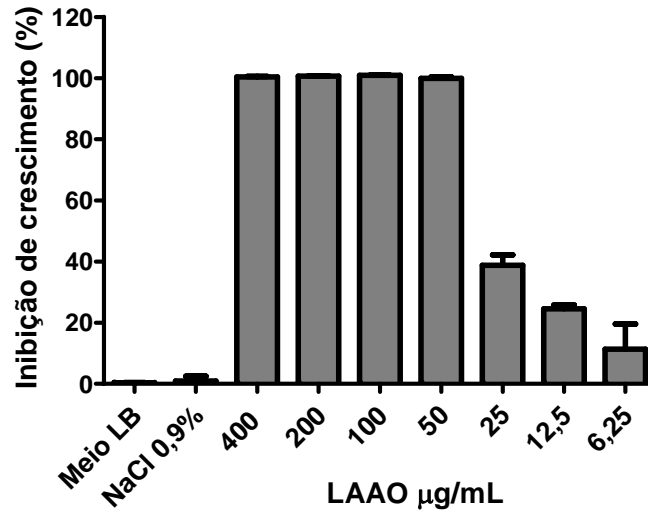
#### 5.3.1. Avaliação da atividade antimicrobiana

A atividade antimicrobiana foi realizada contra *Staphylococcus aureus* (ATCC 33591), uma espécie de bactéria Gram-positiva, anaeróbia facultativa, patogênica e de forma esférica. Juntamente com a *Escherichia coli*, é uma das bactérias simbiotes do homem. Como controles para ausência de crescimento e crescimento pleno foram utilizados, respectivamente, gentamicina e NaCl 0,9% estéril. A Gentamicina é um antibiótico da classe dos aminoglicosídeos, produzido por um actinomiceto, a *Micromonospora purpúrea* e seu mecanismo de ação consiste na inibição da síntese protéica, portanto, possui amplo espectro de ação. Utilizando esses padrões, foram feitos testes antimicrobianos após cada etapa de purificação (apresentadas anteriormente) e para determinação da CIM, CBM e espectro de ação da LAAO purificada.

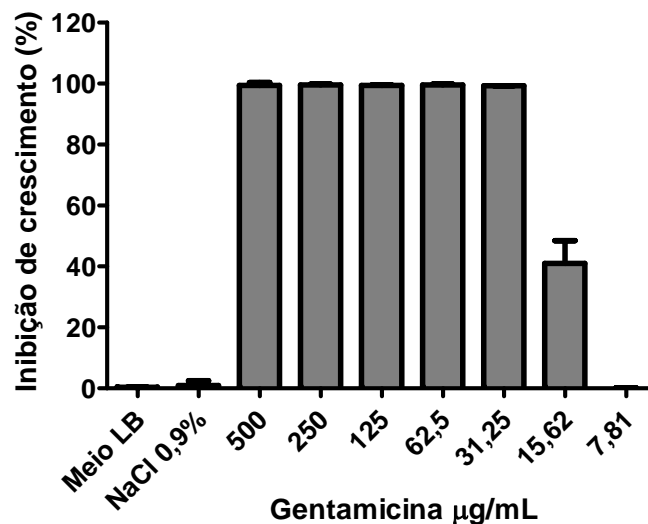
##### 5.3.1.1. Determinação da concentração inibitória mínima

Para determinar a concentração inibitória mínima contra a bactéria patogênica *S. aureus*, foram feitas diluições seriadas da LAAO purificada a partir de uma solução estoque de 400 µg/mL. Esse mesmo procedimento foi realizado para o antibiótico comercial, a gentamicina, a partir de uma solução estoque de 500 µg/mL. A CIM da LAAO isolada de *B. jararacussu* contra *S. aureus* (ATCC 33591) foi 50 µg/mL (Figura 11), enquanto que para a gentamicina, o valor obtido foi 31,25 µg/mL (Figura 12).





**Figura 11.** Concentração inibitória mínima (CIM) da LAAO isolada de *B. jararacussu* contra *S. aureus* (ATCC 33591). Alíquotas de 25 µL de diluições seriadas da proteína pura foram incubadas com 100 µl de suspensão bacteriana. Após a incubação por um período de 22 h a 37°C, as placas foram analisadas a 600 nm em leitora de microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

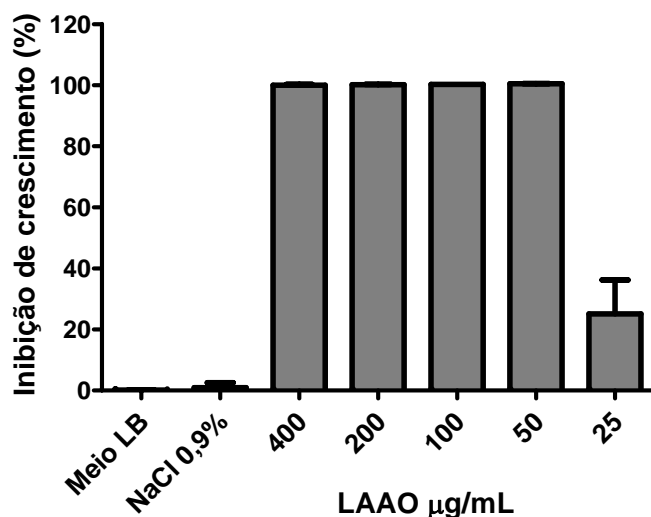


**Figura 12.** Concentração inibitória mínima (CIM) do antibiótico comercial gentamicina contra *S. aureus* (ATCC 33591). Alíquotas de 25 µL de diluições seriadas da gentamicina foram incubadas com 100 µl de suspensão bacteriana. Após a incubação por um período de 22 h a 37°C, as placas foram analisadas a 600 nm em leitora de microplacas. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

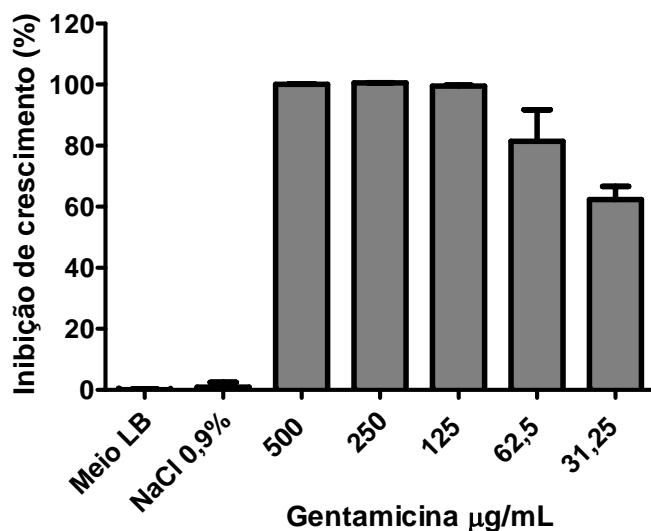
Stábeli e colaboradores (2004) avaliaram a atividade antimicrobiana da Balt-LAAO-I, isolada de *B. alternatus*, contra *S. aureus*. Após 1 hora de incubação com 48 µg da LAAO, a porcentagem de unidades formadoras de colônia (CFU) foi reduzida a 20%. Estudo conduzido por Paiva e colaboradores (2011) revelou o efeito bactericida da LAAO extraída do veneno de serpente *B. atrox* contra *S. aureus*, que ocorreu após 30 minutos de tratamento com 48 µg da BatroxLAAO. Os resultados apresentados neste trabalho foram obtidos com somente 1,25 µg da enzima purificada (25 µL da enzima numa concentração 50 µg/mL), portanto, a LAAO isolada mostrou grande potencial bactericida, sendo 38 vezes mais eficiente que LAAOs obtidas de outros venenos de serpentes do gênero *Bothrops*.

#### **5.3.1.2. Determinação da concentração bactericida mínima**

A concentração bactericida mínima foi obtida a partir dos poços que não apresentaram nenhum crescimento do ensaio para determinação da MIC. Uma alíquota de 25 µL desses poços foi transferida para poços de outra microplaca contendo 100 µL de LB estéril. Os controles também foram reinoculados. A menor concentração de LAAO onde não houve crescimento microbiano, portanto considerada como bactericida, foi 50 µg/mL (Figura 13), enquanto que para a gentamicina, o valor de CBM obtido foi 125 µg/mL (Figura 14). Dessa forma, esses resultados mostram que a LAAO purificada é um potente agente bactericida, sendo 2,5 vezes mais efetivo que o antibiótico comercial.



**Figura 13.** Concentração bactericida mínima (CBM) da LAAO isolada de *B. jararacussu* contra *S. aureus* (ATCC 33591). Uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  dos poços que não apresentaram crescimento foi transferida para poços de outra microplaca contendo 100  $\mu\text{L}$  de LB estéril. Os controles também foram reinoculados. A microplaca foi incubada em estufa a 37°C durante 22 h. A menor diluição onde não houve crescimento foi considerada como a CBM.



**Figura 14.** Concentração bactericida mínima (CBM) do antibiótico comercial gentamicina contra *S. aureus* (ATCC 33591). Uma alíquota de 25  $\mu\text{L}$  dos poços que não apresentaram crescimento foi transferida para poços de outra microplaca contendo 100  $\mu\text{L}$  de LB estéril. Os controles também foram reinoculados. A microplaca foi incubada em estufa a 37°C durante 22 h. A menor diluição onde não houve crescimento foi considerada como a CBM.

### 5.3.1.3. Análise do potencial bactericida

Para avaliar o potencial antibacteriano, diferentes concentrações da LAAO purificada foram testadas contra linhagens referenciais de bactérias Gram-positivas e Gram-negativas, responsáveis por algumas patologias humanas (Tabela 4).

A LAAO foi efetiva contra as bactérias Gram-positivas *Listeria monocytogenes* (ATCC 7644) (CIM 25 µg/mL), *Bacillus subtilis* (ATCC 23858) (CIM 100 µg/mL, CBM 200 µg/mL) e *Bacillus cereus* (ATCC14579) (CIM 400 µg/mL), e contra as bactérias Gram-negativas *Proteus vulgaris* (ATCC 13315) (CIM 25 µg/mL, CBM 50 µg/mL) e *Citrobacter freundii* (ATCC 8090) (CIM 100 µg/mL, CBM 100 µg/mL).

A ação bactericida foi observada contra as bactérias *Bacillus subtilis*, *Proteus vulgaris* e *Citrobacter freundii*, sendo que *Proteus vulgaris* e *S. aureus* se mostraram mais sensíveis a essa enzima (CBM 50 µg/mL). Contra a bactéria *Listeria monocytogenes*, o efeito foi apenas bacteriostático. A concentração de 25 µg/mL da enzima foi capaz de impedir o crescimento dessa bactéria, mas não induziu a morte das células, já que todos os poços, quando transferidos para outra placa, apresentaram crescimento, não sendo possível determinar a CBM. Já para a bactéria *Bacillus cereus*, a concentração de 400 µg/mL foi suficiente para inibir o crescimento, porém, não ocasionou a morte das células. Para avaliar um possível efeito bactericida sobre esta cepa será necessário conduzir um novo ensaio, onde deverá ser empregada a enzima em maior concentração. Para as demais bactérias testadas, não foi possível detectar nenhum efeito da LAAO na concentração de 400 µg/mL.

Quanto ao mecanismo de ação, é possível que o efeito não seja mediado somente pela produção de peróxido de hidrogênio, composto altamente reativo, mas talvez por uma interação específica entre a célula-alvo e a LAAO, já que diferentes tipos de bactéria (Gram-negativas e Gram-positivas) foram utilizados, e o efeito apresentado foi independente do tipo. Diante do exposto mais estudos são necessários para elucidar as possíveis formas de atuação da enzima e assim possibilitar um melhor entendimento do seu potencial antimicrobiano.

**Tabela 4:** Espectro de ação da LAAO purificada contra bactérias Gram-positivas e Gram-negativas.

	<b>Bactérias</b>	<b>CIM<sup>a</sup></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>CBM<sup>b</sup></b> <b>(µg/mL)</b>	<b>Patologia</b>
<b>Gram-positivas</b>	<i>Staphylococcus aureus</i> (ATCC 33591)	50	50	Infecção hospitalar
	<i>Listeria monocytogenes</i> (ATCC 7644)	25	NI*	Gastroenterite
	<i>Bacillus cereus</i> (ATCC14579)	400	NI	Intoxicação alimentar
	<i>Bacillus subtilis</i> (ATCC 23858)	100	200	-
<b>Gram-negativas</b>	<i>Enterobacter sakazakii</i> (ATCC 29004)	NI	NI	Enterocolite
	<i>Escherichia coli</i> (ATCC 29214)	NI	NI	Intoxicação alimentar
	<i>Moraxella catarrhalis</i> (ATCC 25238)	NI	NI	Infecção respiratória
	<i>Proteus vulgaris</i> (ATCC 13315)	25	50	Infecção do trato urinário
	<i>Shigella flexneri</i> (ATCC 12022)	NI	NI	Diarréia
	<i>Citrobacter freundii</i> (ATCC 8090)	100	100	Infecções oportunistas
	<i>Salmonella typhimurium</i> (ATCC 14028)	NI	NI	Intoxicação alimentar

<sup>a</sup> Concentração inibitória mínima

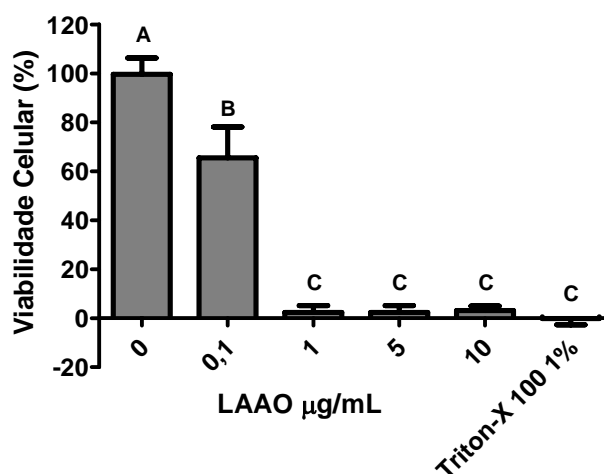
<sup>b</sup> Concentração bactericida mínima

\* Não inibiu o crescimento na concentração de 400 µg/mL

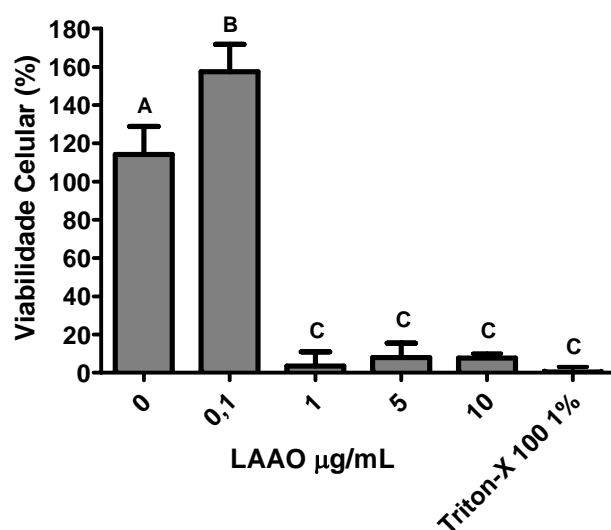
### 5.3.2. Efeito citotóxico sobre células tumorais

Para a análise da atividade antitumoral foram utilizadas as linhagens celulares B16F10 de melanoma murino e MB231 de adenocarcinoma de mama humano, tratadas ou não com LAAO em várias concentrações (0,1; 1; 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle de 100% de viabilidade celular, e como controle de morte celular (0% de viabilidade) foram utilizadas as culturas tratadas com Triton-X 100 1%.

A LAAO na concentração de 0,1  $\mu\text{g/mL}$  reduziu a viabilidade celular em 35% sobre a linhagem B16F10 (Figura 15), já esta mesma concentração não teve nenhum efeito citotóxico sobre a linhagem MDA-MB231 (Figura 16). Na concentração de 1  $\mu\text{g/mL}$ , o efeito citotóxico foi de praticamente 100% sobre as duas linhagens, ou seja, esta concentração foi suficiente para ocasionar total morte celular.



**Figura 15.** Efeito citotóxico da LAAO isolada sobre células B16F10 (melanoma murino) pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas por 48 horas a 37 °C com diferentes concentrações da enzima (0,1; 1; 5 e 10  $\mu\text{g/mL}$ ). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle de 100% de viabilidade celular, e como controle de morte celular (0% de viabilidade) foram utilizadas as culturas tratadas com Triton-X 100 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração testada. Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



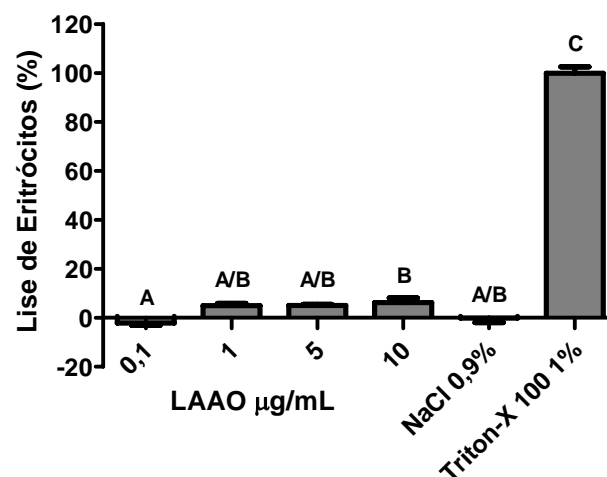
**Figura 16.** Efeito citotóxico da LAAO isolada sobre células MDA-MB231 (adenocarcinoma de mama) pelo ensaio de MTT. As células foram incubadas por 48 horas a 37 °C com diferentes concentrações da enzima (0,1; 1; 5 e 10 µg/mL). As culturas não tratadas foram utilizadas como controle de 100% de viabilidade celular, e como controle de morte celular (0% de viabilidade) foram utilizadas as culturas tratadas com Triton-X 100 1%. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração testada. Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.

Alves e colaboradores (2008) também avaliaram o efeito da LAAO isolada de *B. atrox* sobre células B16F10. A exposição dessas células à LAAO na concentração de 25 µg/mL resultou na inibição de 62,15% do crescimento celular comparado ao controle. Ainda, foi revelado que a citotoxicidade foi inibida pela catalase, então o  $H_2O_2$  produzido parece exercer importante papel na morte celular. Adicionalmente, a microscopia de fluorescência revelou aumento da apoptose após tratamento com BatroxLAAO, confirmada pela ativação das caspases.

### 5.3.3. Efeito citotóxico sobre eritrócitos

Para avaliar o efeito da LAAO purificada sobre células do sangue periférico, eritrócitos humanos O, Rh<sup>+</sup> de doadores saudáveis foram tratados com diferentes concentrações da LAAO. Após 24 horas de incubação, foi feita a análise de lise das células.

Comparadas ao controle de ausência de lise (NaCl 0,9%), os tratamentos contendo 0,1; 1, 5 e 10 µg/mL da enzima não diferiram significativamente (Figura 17), portanto, não induziram a lise de eritrócitos. Entretanto, como anteriormente relatado, o tratamento das linhagens tumorais com a LAAO em concentrações a partir de 1 µg/mL revelou a ação citotóxica da enzima. Diante das evidências, é possível inferir que a LAAO isolada apresenta potencial uso terapêutico.



**Figura 17.** Efeito citotóxico da LAAO isolada sobre eritrócitos humanos O<sup>+</sup>. A suspensão de eritrócitos foi incubada por 24 horas a temperatura ambiente com diferentes concentrações da enzima (0,1; 1; 5 e 10 µg/mL). Os controles para 100% e 0% de lise celular foram, respectivamente, Triton-X 100 1% e NaCl 0,9%. Os experimentos foram realizados em triplicata para cada concentração testada. Letras iguais representam grupos estatisticamente iguais ( $p < 0,05$ ) pelo teste de Tukey.



## 6. CONCLUSÕES

- A LAAO de *B. jararacussu* foi isolada em três etapas de purificação.
- A massa molecular estimada foi de aproximadamente 68 kDa.
- A LAAO purificada apresentou maior especificidade enzimática por L-Fen, seguida por L-Met e L-Arg.
- A análise dos peptídeos tripticos e da sequência N-terminal forneceu, respectivamente, 42% e 56% de identidade com a BjuusuLAAO-I, podendo se tratar de uma nova LAAO isolada de *B. jararacussu*.
- A LAAO isolada apresentou atividade antimicrobiana contra *Proteus vulgaris*, *Citrobacter freundii*, *Listeria monocytogenes*, *Bacillus cereus*, *Bacillus subtilis* e *Staphylococcus aureus*.
- A LAAO mostrou um potente efeito citotóxico contra as linhagens tumorais B16F10 e MDA-MB231, mas não apresentou nenhum efeito citotóxico sobre eritrócitos humanos nas concentrações analisadas.
- Trata-se, portanto, de um potencial biofármaco, seja contra infecções causadas por microrganismos, seja como terapias promissoras contra diferentes tipos de câncer.
- Sugere-se a realização de mais estudos com o intuito de elucidar os possíveis mecanismos de ação da LAAO caracterizada neste trabalho.

## 7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- Arcangeli, A., Becchetti, A., 2010. New trends in cancer therapy: Targeting ion channels and transporters. **Pharmaceuticals**, 3 (4), 1202-1224.
- Alves, R. M., Antonucci, G.A., Paiva, H. H., Cintra, A. C. O., Franco, J. J., Mendonça-Franqueiro, E. P., Dorta, D. J., Giglio, J. R., Rosa, J. C., Fuly, A. L., Dias-Baruffi, M., Soares, A. M., Sampaio, S. V., 2008. Evidence of caspase-mediated apoptosis induced by L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops atrox* snake venom. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, 151 (4), 542-550.
- Amendola, L. C. B., Vieira, R., 2005. A contribuição dos genes BRCA na predisposição hereditária ao câncer de mama. **Revista Brasileira de Cancerologia**, 51 (4), 325-330.
- Andreu, D., Rivas, L., 1998. Animal antimicrobial peptides: An overview. **Biopolymers**, 47, 415-433.
- Arnold, S.J., 1983. Morphology, performance and fitness. **American Zoologist**, 23, 347-361.
- Bachère, E., Destoumieux, D., Bulet, P., 2000. Penaeidins, antimicrobial peptides of shrimp: a comparison with other effectors of innate immunity. **Aquaculture**, 191, 71-88.
- Beraud, E., Chandy, K.G., 2011. Therapeutic potential of peptide toxins that target ion channels. **Inflammation and Allergy - Drug Targets**, 10 (5), 322-342.
- Bdolah, A., 1979. The venom glands of snakes and venom secretion. Snake Venoms. Lee, C.Y. **Spring-Verlag**, New York, 41-57.
- Birkedal-Hansen, H., 1995. Proteolytic remodeling of extracellular matrix. **Current Opinion in Cell Biology**, 7, 728-735.
- Boisbouvier, J., Albrand, J.P., Blackledge, M., Jaquinod, M., Schweitz, H., Lazdunski, M., Marion, D., 1998. A structural homologue of colipase in black mamba venom revealed by NMR floating disulphide bridge analysis. **Journal of Molecular Biology**, 283, 205-219.
- Boman, H.G., 1995. Peptide antibiotics and their role in innate immunity. **Annual Review of Immunology**, 13, 61-92.
- Brasil, 2011a. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Melanoma**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele\\_melanoma/definicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/pele_melanoma/definicao)>. Acesso em: 16 dez. 2011.

- Brasil, 2011b. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **Câncer de mama**. Disponível em: <[http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer\\_mama++](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/mama/cancer_mama++)>. Acesso em: 16 dez. 2011.
- Brinkhous, K.M., Read, M.S., Fricke, W.A., Wagner, R.H., 1983. Botroctetin (venom coagglutinin): reaction with a broad spectrum of multimeric forms of factor VIII macromolecular complex. **Proceedings of National Academy of Sciences U.S.A**, 80, 1463-1466.
- Brogden, K.A., 2005. Antimicrobial peptides: pore formers or metabolic inhibitors in bacteria? **Nature Reviews Microbiology**, 3, 238-250.
- Bulet, P., Stocklin, R., Menin, L., 2004. Antimicrobial peptides: from invertebrates to vertebrates. **Immunological Reviews**, 198, 169-184.
- Caierão, J., Antunes, A.G., Stefens, M., De Marco, M., D'Azevedo, P.A., 2004. Novos antimicrobianos: realidade e perspectiva. **NewsLab**, 66, 80-90.
- Castro, H.C., Dutra, D.L., Oliveira-Carvalho, A.L., Zingali, R.B., 1998. Bothroaltein, a thrombin inhibitor from the venom of *Bothrops alternatus*. **Toxicon**, 36, 1903-12.
- Chippaux, J.P., Williams, V., White, J., 1991. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, 29, 1279-303.
- Chiu, C. C., Lin, K. L., Chien, C. M., Chang, L. S., Lin, S. R., 2009. Effects of Cardiotoxin III on NF- $\kappa$ B function, proliferation, and apoptosis in human breast MCF-7 cancer cells. **Oncology Research Featuring Preclinical and Clinical Cancer Therapeutics**, 17 (7), 311-321.
- Collins, K., Jacks, T., Pavletich, N. P., 1997. The cell cycle and cancer. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 94, 2776–2778.
- Correa-Netto, C., Teixeira-Araujo, R., Aguiar, A. S., Melgarejo, A. R., De-Simone, S. G., Soares, M. R., Foguel, D., Zingali, R. B., 2010. Immunome and venome of *Bothrops jararacussu*: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, 1–14.
- Costa, T. R., Menaldo, D. L., Oliveira, C. Z., Santos-Filho, N. A., Teixeira, S. S., Nomizo, A., Fuly, A. L., Monteiro, M. C., Souza, B. M., Palma, M. S., Stábeli, R. G., Sampaio, S. V., Soares, A. M., 2008. Myotoxic phospholipases A2 isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, 29 (10), 1645-1656.

- Deshimaru, M., Ogawa, T., Nakashima, K., Nobuhisa, I., Chijiwa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Niwa, M., Yamashina, I., Hattori, S., Ohno, M., 1996. Accelerated evolution of crotalinae snake venom gland serine proteases. **FEBS Letters**, 397, 83-88.
- El-Refael, M.F., Sarkar, N.H., 2009. Snake venom inhibits the growth of mouse mammary tumor cells in vitro and in vivo. **Toxicon**, 54, 33-41.
- Ferreira, S.H., Bartelt, D.C., Greene, L.J., 1970. Isolation of bradykinin-potentiating peptides from *Bothrops jararaca* venom. **Biochemistry**, 9, 2583-2593.
- Fry, B.G., Wuster, W., 2004. Assembling an arsenal: origin and evolution of the snake venom proteome inferred from phylogenetic analysis of toxin sequences. **Molecular Biology and Evolution**, 21, 870-883.
- Fry, B.G., Wuster, W., Kini, R.M., Brusic, V., Khan, A., Venkataraman, D., Rooney, A.P., 2003. Molecular evolution and phylogeny of elapid snake venom three-finger toxins. **Journal of Molecular Evolution**, 57, 110-129.
- Ganz, T., Lehner, R.I., 2001. Antimicrobial peptides in innate immunity. In: Development of novel antimicrobial agents: Emerging strategies. (Ed. Karl Iohner). **Horizon Scientific Press**, Wymondham, U.K.
- Geyer, A., Fitzpatrick, T. B., Pawelek, P. D., Kitzing, K., Vrielink, A., Ghisla, S., Macheroux, P., 2001. Structure and characterization of the glycan moiety of L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*. **European Journal of Biochemistry**, 268, 4044-4053.
- Gomes, A., Bhattacharjee, P., Mishra, R., Biswas, A.K., Dasgupta, S.C., Giri, B., 2010. Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian Journal of Experimental Biology**, 48 (2), 93-103.
- Gould, R.J., Polokoff, M.A., Friedman, P.A., Huang, T.F., Holt, J.C., Cook, J.J., Niewiarowski, S., 1990. Disintegrins: a family of integrin inhibitory proteins from viper venoms. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, 195, 168-171.
- Hancock, R.E.W., Diamond, G., 2000. The role of cationic antimicrobial peptides in innate host defenses. **Trends in Microbiology**, 8, 402-410.
- Hider, R.C., Karlsson, E., Namiranian, S., 1991. Separation and purification of toxins from snake venoms. **Snake toxins, international encyclopedia of pharmacology and therapeutics pergamon press**. Harvey, A.L. UK, Elsevier, 1-34.
- Hoge, A.R., Romano-Hoge, S.A.R.W.L., 1978. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil. **Memorial Instituto Butantan**, 42/43, 373-496.

- Izidoro, L. F. M., Ribeiro, M. C., Souza, G. R. L., Sant'Ana, C. D., Hamaguchi, A., Homsí-Brandeburgo, M. I., Goulart, L. R., Beleboni, R. O., Nomizo, A., Sampaio, S. V., Soares, A. M., Rodrigues, V. M., 2006. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 14, 7034-7043.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L., Ho, P.L., 2002. A survey of gene expression and diversity in the venom glands of the pitviper snake *Bothrops insularis* through the generation of expressed sequence tags (ESTs). **Gene**, 299, 279-291.
- Junqueira-de-Azevedo, I.L., Farsky, S.H., Oliveira, M.L., Ho, P.L., 2001. Molecular cloning and expression of a functional snake venom vascular endothelium growth factor (VEGF) from the *Bothrops insularis* pit viper. A new member of the VEGF family of proteins. **Journal of Biological Chemistry**, 276, 39836-39842.
- Kerkis, I., Silva, F.D.S., Pereira, A., Kerkis, A., Rádis-Baptista, G., 2010. Biological versatility of crotamine a cationic peptide from the venom of a South American rattle snake. **Expert Opinion on Investigational Drugs**, 19 (12), 1515-1525.
- Kordis, D., Gubensek, F., 1997. Bov-B long interspersed repeated DNA (LINE) sequences are present in *Vipera ammodytes* phospholipase A2 genes and in genomes of Viperidae snakes. **European Journal of Biochemistry**, 246, 772-779.
- Laemmli, U. K., 1970. Cleavage of Structural Proteins during the Assembly of the Head of Bacteriophage T4. **Nature**, 227, 680 - 685.
- Lu, Q.M., Jin, Y., Wei, J.F., Li, D.S., Zhu, S.W., Wang, W.Y., Xiong, Y.L., 2002. Characterization and cloning of a novel phospholipase A(2) from the venom of *Trimeresurus jerdonii* snake. **Toxicon**, 40, 1313-1319.
- Ma, X. J., Salunga, R., Tuggle, J. T., Gaudet, J., Enright, E., McQuary, P., Payette, T., Pistone, M., Stecker, K., Zhang, B. M., Zhou, Y. X., Varnholt, H., Smith, B., Gadd, M., Chatfield, E., Kessler, J., Baer, T. M., Erlander, M. G., Sgroi, D. C., 2003. Gene expression profiles of human breast cancer progression. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, 100 (10), 5974-5979.
- Maget-Diana, R., 1999. The monolayer technique: a potent tool for studying the interfacial properties of antimicrobial and membrane-lytic peptides and their interactions with lipid membranes. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1462, 109-140.
- Markland, F.S., 1998. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, 36 (12), 1749-1800.

- Matsuzaki, K., Sugishita, K-I., Harada, M., Fujii, N., Miyaajima, K., 1997. Interactions of an antimicrobial peptide, magainin 2, with outer and inner membranes of Gram-negative bacteria. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1327, 119-130.
- Meier, J.S., Stocker, K.F., 1995. Biology and distribution of venoms snake of medical importance and the composition of snake venoms. **Handbook of clinical toxicology of animal venoms and poisons**. Meier, J.S., White, J. Boca Raton, CRC Press, 367.
- Mendez, M.C., Riet-Correa, F., 1995. Snakebite in sheep. **Veterinary e Human Toxicology**, 37, 62-63.
- Moura-da-Silva, A.M., Desmond, H., Laing, G., Theakston, R.D., 1991. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. **Toxicon**, 29, 713-723.
- Murayama, N., Saguchi, K., Mentele, R., Assakura, M.T., Ohi, H., Fujita, Y., Camargo, A.C., Higuchi, S., Serrano, S.M., 2003. The unusual high molecular mass of *Bothrops* protease A, a trypsin-like serine peptidase from the venom of *Bothrops jararaca*, is due to its high carbohydrate content. **Biochimica et Biophysica Acta**, 1652, 1-6.
- Naghmouchia, K., Kheadra, E., Lacroix, B., Fliss, I., 2007. Class I/Class IIa bacteriocin cross-resistance phenomenon in *Listeria monocytogenes*. **Food Microbiology**, 24, 718-727.
- Nakashima, K., Nobuhisa, I., Deshimaru, M., Nakai, M., Ogawa, T., Shimohigashi, Y., Fukumaki, Y., Hattori, M., Sakaki, Y., Hattori, S., 1995. Accelerated evolution in the protein-coding regions is universal in crotalinae snake venom gland phospholipase A2 isozyme genes. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, 92, 5605-5609.
- Nakashima, K., Ogawa, T., Oda, N., Hattori, M., Sakaki, Y., Kihara, H., Ohno, M., 1993. Accelerated evolution of *Trimeresurus flavoviridis* venom gland phospholipase A2 isozymes. **Proceedings of the National Academy of Sciences U.S.A**, 90, 5964-5968.
- Odell, G.V., Fenton, A.W., Ownby, C.L., Doss, M.P., Schmidt, J.O., 1999. The role of venom citrate. **Toxicon**, 37, 407-409.
- Odell, G.V., Ferry, P.C., Vick, L.M., Fenton, A.W., Decker, L.S., Cowell, R.L., Ownby, C.L., Gutierrez, J.M., 1998. Citrate inhibition of snake venom proteases. **Toxicon**, 36, 1801-1806.
- Oka, S., Arita, H., 1991. Inflammatory factors stimulate expression of group II phospholipase A2 in rat cultured astrocytes. Two distinct pathways of

- the gene expression. **Journal of Biological Chemistry**, 266, 9956-9960.
- Oron, U., Bdolah, A., 1978. Intracellular transport of proteins in active and resting secretory cells of the venom gland of *Vipera palaestinae*. **Journal of Cell Biology**, 78, 488-502.
- Paiva, R. M. A., Figueiredo, R. F., Antonucci, G. A., Paiva, H. H., Bianchi, M. L. P., Rodrigues, K. C., Lucarini, R., Caetano, R. C., Pietro, R. C. L. R., Martins, C. H. G., Albuquerque, S.; Sampaio, S. V., 2011. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by L-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, 93, 941-947.
- Peters, C., Mayer, A., 1998. Ca<sup>2+</sup>/calmodulin signals the completion of docking and triggers a late step of vacuole fusion. **Nature**, 396, 575-580.
- Polyak, K., 2007. Breast cancer: Origins and evolution. **The Journal of Clinical Investigation**, 117 (11), 3155-3163.
- Pough, F.H., Groves, J.D., 1983. Specialization of the body form and food habits of snake. **American Zoologist**, 23, 443-454.
- Sajevic, T., Leonardi, A., Krizaj, I., 2011. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, 57, 627-645.
- Serrano, S.M., Maroun, R.C., 2005. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, 45, 1115-1132.
- Soares, M.R., Oliveira-Carvalho, A.L., Wermelinger, L.S., Zingali, R.B., Ho, P.L., Junqueira-de-Azevedo, I.L., Diniz, M.R., 2005. Identification of novel bradykinin-potentiating peptides and C-type natriuretic peptide from *Lachesis muta* venom. **Toxicon**, 46, 31-38.
- Stábeli, R. G., Marcussi, S., Carlos, G. B., Pietro, R. C. L. R., Selistre-de-Araujo, H. S., Giglio, J. R., Oliveira, E. B., Soares, A. M., 2004. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, 12, 2881-2886.
- Tan, N.H., Fung, S. Y., 2008. Snake venom L-amino acid oxidases and their potential biomedical applications. **Malaysian Journal of Biochemistry and Molecular Biology**, 16 (1), 1-10.
- Tripathi, K.D., 2006. **Farmacologia Médica**. Editora Guanabara Koogan, 5<sup>a</sup> edição.

- Tsetlin, V.I., Hucho, F., 2004. Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. **FEBS Letters**, 557, 9-13.
- Tuong, W., Cheng, L. S., Armstrong, A. W., 2012. Melanoma: Epidemiology, Diagnosis, Treatment, and Outcomes. **Dermatologic Clinics**, 30, 113-124.
- Vishwanath, B.S., Kini, R.M., Gowda, T.V., 1987. Characterization of three edema-inducing phospholipase A2 enzymes from habu (*Trimeresurus flavoviridis*) venom and their interaction with the alkaloid aristolochic acid. **Toxicon**, 25, 501-515.
- Vogt, G., Stocker, W., Storch, V., Zwilling, R., 1989. Biosynthesis of *Astacus* protease, a digestive enzyme from crayfish. **Histochemistry**, 91, 373-381.
- Wren, B. G., 2007. The origin of breast cancer. **Menopause**, 14 (6), 1060-1068.
- Zasloff, M., 2002. Antimicrobial peptides of multicellular organisms. **Nature**, 415, 389-395.
- Zingali, R.B., Jandrot-Perrus, M., Guillin, M.C., Bon, C., 1993. Bothrojaracin, a new thrombin inhibitor isolated from *Bothrops jararaca* venom: characterization and mechanism of thrombin inhibition. **Biochemistry**, 32, 10794-10802.
- Zug, G.R., Vin, L.J., Caldwell, J.P., 2000. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. New York, **Academic Press**.