



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

MARIANA SANTOS MATIAS

ANÁLISE ANTITUMORAL E ANTIAGREGANTE DA Bothalternina:
UMA TOXINA PURIFICADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops alternatus*

UBERLÂNDIA - MG

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS



PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA CELULAR E ESTRUTURAL
APLICADAS

MARIANA SANTOS MATIAS

ANÁLISE ANTITUMORAL E ANTIAGREGANTE DA Bothalernina:
UMA TOXINA PURIFICADA DA PEÇONHA DA SERPENTE *Bothrops alternatus*

Dissertação apresentada ao Programa de Pós Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas do Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Fábio de Oliveira

UBERLÂNDIA - MG

2014

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

M433a Matias, Mariana Santos, 1989-
2014 Análise antitumoral e antiagregante da Bothalernina: uma toxina purificada da peçonha da serpente *Bothrops alternatus* / Mariana Santos Matias. -- 2014.
59 f : il.

Orientador: Fábio de Oliveira.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia, Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.

Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Serpente peçonhenta - Teses. 3. Cobra – Peçonha - Teses. I. Oliveira, Fábio de. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

CDU: 576.3

Á minha amada avó, Maria Aparecida (in memoriam), que sempre esteve do meu lado, incentivando a minha formação.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Jesus, nosso maior mestre, pelo amparo e pela proteção constante. Por ser força nos momentos de maiores dificuldades.

Agradeço aos meus pais, Janice e Júlio, por todo amor dedicado, pela compreensão e apoio. Por todos os esforços e sacrifícios destinados à minha formação. Sem vocês não seria possível à concretização de mais essa etapa. Amo vocês.

A minha irmã, Larissa, um presente lindo de Deus na minha vida. Obrigada por confiar em mim, pela cumplicidade e paciência diária. É maravilhoso poder compartilhar todos os momentos com você. Você é indispensável em minha vida.

Aos meus familiares, que se colocaram a disposição para o que eu precisasse. Obrigada pelo incentivo. Espero sempre corresponder à expectativa de todos.

Aos meus amigos de longa data, pela torcida, conversas e amizade. Espero tê-los sempre por perto. E as amizades que fiz durante minha vida acadêmica, em especial a Karine, Ana Luiza, Melina e Carla, com quem compartilho de todos os momentos.

Agradeço ao professor Fábio de Oliveira, uma pessoa admirável. Orientador e amigo que contribuiu imensamente para minha formação. Obrigada pelo voto de confiança e dedicação ao longo de todos esses anos.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal do Ensino Superior (CAPES), ao Instituto Nacional de Ciência e Tecnologia N-Biofar (INCT-NBiofar), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), ao Centro de Excelência em Bioinformática (CEBio), e à Universidade Federal de Uberlândia (UFU) pelo apoio financeiro para o desenvolvimento deste trabalho.

Aos meus amigos do laboratório, Deborah, Bruna, Thalita, Carla, Mayara, Nádia, Thais, Kelly, Tamires e Alisson. Obrigada pelo companheirismo, amizade, angústias e aprendizado compartilhados.

A todos os professores que colaboraram para a minha formação acadêmica.

Aos funcionários do Instituto de Ciências Biomédicas pela disposição em ajudar.

Meus sinceros agradecimentos a todas as pessoas que contribuíram de maneira direta ou indireta para que eu chegasse até aqui, sempre os levarei comigo na lembrança e no coração. Muito obrigada!

“Entrega ao Senhor as tuas obras, e teus designios serão estabelecidos”.

Provérbios 16: 3

RESUMO

As peçonhas ofídicas constituem uma mistura complexa de proteínas, compostos orgânicos e inorgânicos. Alguns desses compostos proteicos, enzimáticos ou não enzimáticos são capazes de interagir com receptores plaquetários, provocando distúrbios hemostáticos, tais como incoagulabilidade sanguínea, hemorragia e trombose, bem como interagir com componentes da matriz extracelular, ativando ou inibindo o crescimento celular. Devido ao seu interesse médico, esses compostos têm sido isolados de peçonha de serpentes e estudados como potenciais alvos terapêuticos no tratamento e diagnóstico de doenças, como a trombose e o câncer. O presente trabalho teve como objetivo purificar e caracterizar uma toxina presente na peçonha da serpente *Bothrops alternatus*. A toxina, denominada Bothalternina, foi purificada utilizando colunas de cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel) e Fase Reversa (C₂/C₁₈). A análise em eletroforese bidimensional mostrou que Bothalternina apresenta massa molecular aparente de 26 kDa e pI igual a 4.6. A sequência de aminoácidos da região N-terminal foi realizada pela metodologia de Degradação de Edman e revelou a seguinte sequência: (IISPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDA), a qual mostrou identidade com SVMPS da classe PIII. A Bothalternina apresentou um efeito inibitório específico sobre a agregação plaquetária induzida por ristocetina em plasma humano rico em plaqueta. Por outro lado, a toxina não inibiu a agregação induzida pela epinefrina e ADP. A Bothalternina também foi capaz de inibir o crescimento das células tumorais HeLa. Essa toxina pode ser de interesse médico porque mostrou ser capaz de inibir a agregação plaquetária e o crescimento de células tumorais.

Palavras-chave: peçonha de serpentes, *Bothrops alternatus*, tumor, agregação plaquetária.

ABSTRACT

Snakes venoms are a complex mixture of proteins, organic and inorganic compounds. Some of the protein, enzymatic or non-enzymatic compounds are able to interact with platelet receptors, causing hemostatic disorders such as blood incoagulability, hemorrhage and thrombosis, as well as to interact with components of the extracellular matrix, activating or inhibiting cell growth. Because of its medical importance, these compounds acting on hemostasis have been isolated from the venom of snakes and studied as potential therapeutic in the treatment and diagnosis of diseases such as thrombosis and cancer. The present study aimed to purify and to characterize a toxin present in the venom of *Bothrops alternatus*. The toxin called Bothalternina was purified using columns size ion-exchange on DEAE-Sephacel and Reversed Phase (C₂/C₁₈). The analysis of two-dimensional electrophoresis showed that Bothalternina has an apparent molecular mass of 26 kDa and pI to 4.6. The amino acid sequence of the N-terminal region was carried out by Edman degradation method and revealed the following sequence: (IISPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDA), which showed identity with the PIII class SVMPs. Bothalternina had a specific inhibitory effect on platelet aggregation induced by ristocetin in platelet rich human plasma. On the other hand, the toxin did not inhibit the ADP and epinephrine-induced aggregation. Bothalternina was also able to inhibit the growth of HeLa tumor cells. This toxin can be of medical interest because it was shown to inhibit platelet aggregation and tumor cell growth.

Keywords: snake venom, *Bothrops alternatus*, tumor, platelet aggregation.

LISTA DE ILUSTRAÇÃO

FIGURA 1: AS SEIS PRINCIPAIS CARACTERÍSTICAS DO CÂNCER	16
FIGURA 2: EXEMPLAR DA ESPÉCIE DE <i>MICRURUS FRONTALIS</i>	19
FIGURA 3: EXEMPLAR DA ESPÉCIE DE <i>LACHESIS MUTA RHOMBEATA</i>	20
FIGURA 4: EXEMPLAR DA ESPÉCIE DE <i>CROTALUS DURISSUS TERRIFICUS</i>	21
FIGURA 5: EXEMPLAR DA ESPÉCIE DE <i>BOTHROPS ALTERNATUS</i>	21
FIGURA 6: ACIDENTES OFÍDICOS NOTIFICADOS NO BRASIL EM 2012.....	22
FIGURA 7: CLASSIFICAÇÃO DAS SVMPS	26
FIGURA 8: FRACIONAMENTO DA PEÇONHA BRUTA DE <i>BOTHROPS ALTERNATUS</i> EM COLUNA DE DEAE SEPHACEL.	39
FIGURA 9: CROMATOGRAFIA DA FRAÇÃO A8 EM COLUNA C ₂ /C ₁₈	40
FIGURA 10: ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA A 14%	41
FIGURA 11: ALINHAMENTO DA SEQUÊNCIA DA BOTHALTERNINA E DE OUTRAS SVMPS.	42
FIGURA 12: INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA PELA BOTHALTERNINA	43
FIGURA 13: A: EXPOSIÇÃO DAS CÉLULAS HELA A AÇÃO DA PEÇONHA BRUTA DE <i>B. ALTERNATUS</i> E DA BOTHALTERNINA	44
FIGURA 14: CÉLULAS HELA MARCADAS COM ANTICORPO NUCLEAR DAPI.....	45
FIGURA 15: CÉLULAS HELA MARCADAS COM ANTICORPO NUCLEAR DAPI.....	45
FIGURA 16: CÉLULAS HELA MARCADAS COM ANTICORPO NUCLEAR DAPI.....	46
FIGURA 17: IMUNOCITOQUÍMICA COM MARCAÇÃO PARA ANTICORPO CONTRA CASPASE-3 NAS CÉLULAS TUMORAIS HELA	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADP: adenosina difosfato

AMBIC: bicarbonato de amônio

Bis-acrilamida: N, N' metileno-bis-acrilamida

BSA: albumina bovina

DAPI: 4',6-diamidino-2-fenilindol

DEAE : dietilaminoetil

DO: densidade ótica

EDTA: ácido etilenodiaminotetracético

FP3: Fator Plaquetário 3

FT: Fator Tecidual

FvW: Fator de von Willebrand

GP: glicoproteína

HPV: Papiloma vírus humano

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência, do inglês: High Performance Liquid Chromatography

INCA: Instituto Nacional do Câncer

KGD: lisina-glicina-aspartato

LAAO: L-aminoácido oxidase

MEC: matriz extracelular

MTT: brometo de 3-[4,5-dimetil-tiazol-2-il]-2,5-difeniltetrazólio

MVD: metionina-valina-aspartato

NO: óxido nítrico

PAGE: eletroforese em gel de poliacrilamida

PARs: receptores ativados por protease

PBS: tampão fosfato

PPP: plasma pobre em plaquetas

PRP: plasma rico em plaquetas

RGD: arginina-glicina-aspartato

SDS: dodecil sulfato de sódio

SFB: soro fetal bovino

SVMPs: metaloprotease de peçonhas de serpente, do inglês: Snake Venom Metalloproteinases

Tris: tris (hidroximetil) amino metano

VGD: valina-glicina-aspartato

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	15
2.1 NEOPLASIAS	15
2.2 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	17
2.3 SERPENTES BRASILEIRAS	18
2.4 ACIDENTES OFÍDICOS	22
2.5 PEÇONHA DE SERPENTES	23
2.6 METALOPROTEASES	24
3 OBJETIVOS.....	30
3.1 OBJETIVO GERAL.....	30
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	30
4 MATERIAL E MÉTODOS	31
4.1 OBTENÇÃO DA PEÇONHA	31
4.2 ANIMAIS	31
4.3 OBTENÇÃO DO SANGUE HUMANO.....	31
4.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS.....	31
4.5 PURIFICAÇÃO DA BOTHALTERNINA	32
4.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM AGENTES DESNATURANTES.....	32
4.7 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO	33
4.8 COLORAÇÃO E DESCOLORAÇÃO	34
4.9 SEQUENCIAMENTO N- TERMINAL	34
4.10 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE A CASEÍNA	34
4.11 ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA.....	35
4.12 ATIVIDADE COAGULANTE	35
4.13 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE	35
4.14 ATIVIDADE HEMORRÁGICA.....	36
4.15 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	36
4.16 AVALIAÇÃO <i>in vitro</i> DO EFEITO ANTITUMORAL DA Bothalternina	36
4.17 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	38
5 RESULTADOS.....	39
5.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BOTHALTERNINA.....	39
5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BOTHALTERNINA SOBRE A INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA	42
5.3 AVALIAÇÃO <i>IN VITRO</i> DO EFEITO ANTITUMORAL DA BOTHALTERNINA.....	44
6 DISCUSSÃO.....	47
7 CONCLUSÃO	51
REFERÊNCIAS.....	52
Anexo 1:.....	59
Anexo 2:.....	60

1 INTRODUÇÃO

O isolamento e a caracterização dos compostos presentes nas peçonhas de serpentes constituem o foco de pesquisas científicas na atualidade. Dentre as substâncias presentes nas peçonhas, destacam-se aquelas que possuem efeitos terapêuticos e, portanto, são de interesse clínico. A acetilcolinesterase age inibindo a transmissão nervosa podendo levar a parada cardiorrespiratória, as hialuronidases aumentam a perfusão entre os tecidos, as ADPases que inibem a agregação plaquetária, compostos que afetam a hemostasia, e aqueles que degradam as proteínas de matriz extracelular são alguns exemplos de moléculas encontradas.

As peçonhas de serpentes são ricas em compostos farmacologicamente ativos que interferem no sistema hemostático e na adesão celular, em especial as SVMPs, que apresentam diversos mecanismos capazes de interferir na função plaquetária e inibição do crescimento de células tumorais, devido à sua alta complexidade estrutural e funcional com múltiplos domínios que sinalizam seus efeitos biológicos. Uma investigação detalhada desses componentes presentes em peçonha de serpentes pode fornecer informações para o desenvolvimento de drogas que podem ser aplicadas nos campos médicos e farmacológicos da hemostasia e do câncer.

A peçonha de serpentes da espécie *Bothrops alternatus*, conhecida popularmente como jararaca, foi utilizada neste trabalho por ser uma das responsáveis pelos acidentes ofídicos de maior importância epidemiológica no país. São facilmente encontradas no Brasil devido à sua distribuição geográfica em todo território nacional.

O presente trabalho descreve a purificação e a caracterização de uma toxina da serpente *Bothrops alternatus*. A toxina purificada mostra ser de interesse médico porque é capaz de inibir a agregação plaquetária e o crescimento de células tumorais uterinas, ambos em humanos. Este trabalho foi desenvolvido no Laboratório de Biologia Molecular e Celular da Universidade Federal de Uberlândia, sob a orientação do Prof. Dr. Fábio de Oliveira. O trabalho contou com a colaboração da Profa. Dra. Renata Zanon do Laboratório de Neuroanatomia (Universidade Federal de Uberlândia), onde foram realizados os ensaios de Imunocitoquímica e, também, do Prof. Dr. Andreimar Martins Soares (Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde - Fiocruz/RO), o qual foi responsável pelo sequenciamento da região N-terminal e a determinação do pI da toxina purificada.

2 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

2.1 NEOPLASIAS

O crescimento normal de um tecido é resultante do equilíbrio entre a taxa de proliferação e destruição celular, ou seja, mitose e apoptose. Para isso, é necessário um delicado balanço entre reguladores de vias pró e antiapoptóticas que controlam esse processo garantindo a manutenção da homeostase (DENMEADE e ISAACS, 2005).

O processo de carcinogênese inicia-se quando esse equilíbrio é alterado em favor do prolongamento da sobrevivência celular, situação que acontece após uma série de alterações moleculares que fazem com que a célula adquira o fenótipo maligno.

Diferentes sistemas regulatórios precisam estar alterados para que uma célula normal cresça como um câncer, isto é, elas precisam adquirir cinco ou seis habilidades para serem consideradas malignas (fig. 1). A primeira característica é o crescimento, mesmo na ausência dos sinais de indução, ou seja, as células cancerígenas continuam a se dividir em situações nas quais células normais aguardariam o repouso por uma sinalização química. A segunda é o crescimento apesar dos comandos de “pare”, emitidos pelas células adjacentes que são comprimidas pela expansão do tumor (inibição por contato). A terceira é a evasão de mecanismos de morte celular programada. Em células saudáveis, um dano genético em um nível crítico, geralmente, ativa os mecanismos apoptóticos, no entanto, as células cancerígenas ignoram esses comandos. A quarta é a habilidade para estimular a angiogênese. Como o tumor necessita de oxigênio e nutrientes para sobreviver, eles adquirem a capacidade de estimular a formação de novos vasos sanguíneos. A quinta característica é uma imortalidade efetiva, ou seja, a capacidade que a célula tumoral adquire de se dividir infinitas vezes. A sexta propriedade é a habilidade de invadir um tecido próximo e causar metástases, invadindo outros órgãos (HAHN e WEINBERG, 2002).

A neoplasia é, portanto, uma proliferação celular autônoma, acompanhada de perda da diferenciação, caracterizada por uma massa anormal de tecido, cujo crescimento e divisão encontram-se desordenados quando comparados aos tecidos normais (RÁDIS-BAPTISTA, 2005).

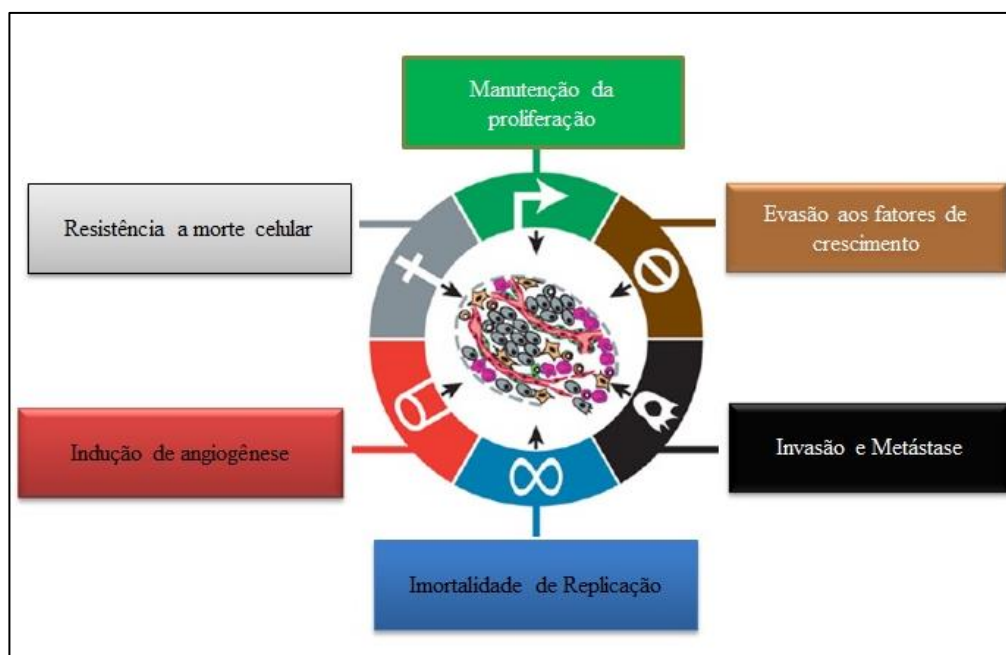


Figura 1: As seis principais características do câncer (HANAHAN, 2011).

Fonte: Adaptado de Hallmarks of Cancer: The Next Generation

Existem vários tipos de câncer. O carcinoma começa na pele ou nos tecidos que revestem os órgãos internos. O sarcoma é um tumor que começa nos ossos, músculos, cartilagens, gorduras, vasos sanguíneos, ou no tecido conjuntivo. A leucemia é o câncer que começa nos tecidos hematopoiéticos, como a medula óssea, e faz com que um grande número de células anormais seja produzido e entrem na corrente sanguínea. O linfoma ou mieloma múltiplos são tumores que se iniciam nas células do sistema imunológico (NIC, 2011).

O câncer do colo do útero, também chamado de cervical, demora muitos anos para se desenvolver. As alterações das células que podem desencadear o câncer são descobertas facilmente no exame preventivo (conhecido também como Papanicolau). Por isso, é importante a sua realização periódica. A principal alteração que pode levar a esse tipo de câncer é a infecção pelo papiloma vírus humano, o HPV, com alguns subtipos de alto risco e relacionados a tumores malignos. É o terceiro tumor mais frequente na população feminina, atrás do câncer de mama e do colo-retal, e a quarta causa de morte de mulheres por câncer no Brasil. Diagnósticos realizados precocemente, quando tratados de forma adequada, têm praticamente 100% de chance de cura. Segundo o INCA, há a estimativa do surgimento de 15.590 novos casos em 2014.

2.2 AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

As plaquetas são consideradas células incompletas, uma vez que são produzidas a partir da quebra do citoplasma de megacariócitos na medula óssea. Apresentam aspecto granular e são as menores células do sangue humano medindo cerca de 2 - 4µm de diâmetro (JURK e KEHREL, 2005). Durante a lesão vascular as plaquetas são recrutadas da circulação para a matriz subendotelial exposta formando um tampão hemostático para conter a hemorragia (KAMIGUTI, 2005).

A adesão plaquetária à parede do vaso danificado é a primeira etapa da hemostasia envolvendo a participação das plaquetas. As plaquetas apresentam diversos receptores glicoproteicos na superfície de sua membrana que, ativos, são responsáveis pela mudança de conformação, adesão ao endotélio e agregação a outras plaquetas. Estes receptores são ativados por diferentes agonistas (KAMIGUTI, 2005). Dentre os diversos receptores de adesão, o complexo glicoprotéico GPIb/IX/V e a GpVI, que liga a plaqueta respectivamente ao Fator de von Willebrand (FvW) e ao colágeno subendotelial, são os principais responsáveis pela regulação da adesão plaquetária inicial e sua ativação no sangue circulante (ANDREWS e BERNDT, 2000). Essa ligação induz a secreção de ADP, que aumenta a afinidade da integrina α Ib β 3 pelo FvW (GAWAZ, 2004). O antibiótico ristocetina é capaz de induzir a interação GPIb/IX/V-FvW *in vitro* (JURK e KEHREL, 2005). Diferentemente da GPIb/IX/V, a GPVI atua como mediador da ativação de diferentes receptores adesivos, incluindo as integrinas α Ib β 3 e α 2 β 1. O receptor GPVI é essencial para a adesão e agregação plaquetária em colágeno imobilizado *in vitro* (GAWAZ, 2004).

O processo de adesão das plaquetas é complexo e depende da tensão de cisalhamento. Em baixas condições de cisalhamento, as plaquetas aderem predominantemente ao colágeno, fibronectina e laminina através de integrinas β 1. Em condições de alto cisalhamento, as plaquetas aderem ao FvW através da GPIb, iniciando a ativação plaquetária (MARKLAND, 1998; KAMIGUTI, 2005).

A adesão plaquetária induz rápida transdução de sinais que desencadeia uma série de eventos, como a ativação plaquetária, alterações no citoesqueleto, difusão e secreção do conteúdo granular e ativação de integrinas que sustentarão a adesão e a agregação.

As desintegrinas são uma família de pequenos polipeptídeos não enzimáticos (40-100 resíduos de aminoácidos) ricos em cisteína, presentes em peçonha de viperídeos. São liberados na peçonha por processamento proteolítico das metaloproteases da classe P-II ou

sintetizados diretamente a partir de mRNAs. Esses polipeptídeos, em sua maioria, apresentam a sequência tripeptídica RGD (arginina-glicina-aspartato), com exceção da Barbourin (SCARBOROUGH, 1991) e Ussuristatin 2 (OSHIKAWA e TERADA, 1999), duas desintegrinas que possuem a sequência ativa KGD (lisina-glicina-aspartato), e a Atrolysin E (HITE, 1992), que possui o motivo MVD (metionina-valina-aspartato).

As desintegrinas são capazes de interagir com integrinas presentes na superfície celular desencadeando inúmeros processos celulares (CALVETE, 2005; KINI e EVANS, 1992; OKUDA, 2002). O resíduo conservado de aspartato foi apontado como responsável pela ligação às integrinas, enquanto os outros dois resíduos do motivo fornecem especificidade (CALVETE, 2003). A atividade das desintegrinas também é influenciada pela sua região C-terminal, interferindo na especificidade e intensidade de ligação com as integrinas. Isso explica o fato de diferentes desintegrinas contendo um mesmo motivo de ligação apresentar afinidade e seletividade de ligação diferente para a integrina (CALVETE, 2005).

A família das desintegrinas pode ser dividida em cinco grupos diferentes de acordo com o tamanho e o número de pontes dissulfeto (CALVETE, 2003). O primeiro grupo inclui desintegrinas pequenas, formadas por 41-51 resíduos de aminoácidos e quatro pontes dissulfeto. As desintegrinas de tamanho médio, com cerca de 70 resíduos de aminoácidos e seis pontes dissulfeto compõem o segundo grupo. O terceiro grupo inclui as desintegrinas de maior tamanho, com 84 resíduos e sete pontes dissulfeto. Um quarto grupo é formado pelas *disintegrin-like* originadas pelo processamento proteolítico das metaloproteases da classe P-III. Essas desintegrinas apresentam aproximadamente 100 resíduos de aminoácidos e oito pontes dissulfeto, e possuem sequências alternativas ao motivo RGD, substituindo-o por sequências XXCD (x-x-cisteína-aspartato). Diferentemente dos demais grupos que são moléculas monoméricas, o quinto grupo é composto por homo e heterodímeros (CALVETE, 2005).

2.3 SERPENTES BRASILEIRAS

As serpentes são encontradas em quase todos os ambientes do globo terrestre, são animais muito bem adaptados e abundantes, somando aproximadamente 3000 espécies no mundo, distribuídas em cerca de 470 gêneros e 20 famílias (HICKMAN, 2004). No Brasil, foram catalogadas 386 espécies de serpentes, das quais 60 são peçonhentas e despertam interesse na saúde pública (BÉRNILS e COSTA, 2012).

Frey Vogel e Perret (1973) definiram as serpentes peçonhentas como aquelas com a capacidade de produzir substâncias tóxicas e inoculá-las em suas vítimas por meio de presas. Aquelas serpentes que não apresentam o aparato inoculador de peçonha são classificadas como não peçonhentas, mas podem provocar ferimentos graves por estrangulamento ou infecção (CARDOSO, 2003). Acidentes causados por serpentes não peçonhentas são relativamente frequentes, porém não determinam acidentes graves, na maioria dos casos e, por isso, são considerados de baixa importância médica (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MS, 2009).

As serpentes peçonhentas brasileiras estão distribuídas em duas principais famílias: Elapidae e Viperidae (FUNASA, 2001). A primeira compreende 55 gêneros, entre eles o gênero *Micrurus* (fig. 2), principal representante de importância médica dessa família, com cerca de 40 espécies e subespécies distribuídas pelo território nacional (BÉRNILS e COSTA, 2012; BUCARETCHI, 2006). São conhecidas popularmente por coral verdadeira e são animais de pequeno porte, em torno de 1,0 metro. Apresentam um padrão de cor característico em anéis vermelhos, brancos e pretos em diferentes combinações, possuem dentes inoculadores pouco desenvolvidos e pequena abertura bucal (FUNASA, 2001). Devido a essas características e ao hábito de viverem enterradas, preferencialmente em buracos, os acidentes são mais raros, aproximadamente 0,7% (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MS, 2009).



Figura 2: Exemplar da espécie de *Micrurus frontalis*.

Fonte: <http://www.ib.usp.br>

As serpentes da família Viperidae representam o grupo de maior importância para a saúde pública, pois são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos registrados no Brasil (AZEVEDO-MARQUES, 2003). Essas serpentes são facilmente identificadas pela cabeça triangular, presença de fosseta loreal e dentição solenóglifa. A subfamília Crotalinae possui 36 espécies e subespécies representadas pelos gêneros *Bothrocophias*, *Bothrops*, *Crotalus* e *Lachesis* (BÉRNILS e COSTA, 2012).

O gênero *Lachesis* é representado apenas pela espécie *L. muta* (fig. 3), com duas subespécies predominantes: *L. muta muta* e *L. muta rhombeata* (ZAMUDIO e GREENE, 1997). São popularmente conhecidas por surucucu e são as maiores serpentes peçonhentas das Américas, podendo atingir até 3,5 metros. Habitam ambientes florestais como Amazônia, Mata Atlântica e matas úmidas do Nordeste (FUNASA, 2001).



Figura 3: Exemplar da espécie de *Lachesis muta rhombeata* (Wied, 1825).

Fonte: <http://www.fiocruz.br/biosseguranca/Bis/infantil/surucucu.html>

As serpentes do gênero *Crotalus* são representadas no Brasil por uma única espécie, *C. durissus* (fig. 4), conhecidas popularmente por cascavéis ou maracás. São encontradas em campos abertos, áreas secas e raramente na faixa litorânea (FUNASA, 2001). As serpentes desse gênero são facilmente identificadas pela presença de guizo ou chocalho na extremidade caudal (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MS, 2009).



Figura 4: Exemplar da espécie de *Crotalus durissus terrificus*.

Fonte: <http://www.tc.umn.edu/~gamb1007/Vipers.html>

O gênero *Bothrops* (incluindo *Bothrocophias*) representa o grupo mais importante de serpentes peçonhentas brasileiras, com cerca de 30 espécies e subespécies, distribuídas por todo o território nacional (BÉRNILS e COSTA, 2012; SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MS, 2009). Este gênero possui cauda lisa, cores variadas dependentes da espécie e da localização (CARDOSO, 2003). Popularmente são chamadas de jararaca ou jararacuçu. Habitam preferencialmente ambientes úmidos como matas, zonas rurais e periferias de grandes cidades. Possuem hábitos noturnos, apresentam comportamento agressivo quando ameaçadas e atacam sem provocar ruídos. A serpente utilizada nesse trabalho, *Bothrops alternatus* (fig. 5), recebe o nome popular de urutu, possui alta prevalência na região do Triângulo Mineiro, sendo uma das responsáveis pela maioria dos casos de acidentes registrados no Hospital de Clínicas de Uberlândia (FUNASA, 2001).



Figura 5: Exemplar da espécie de *Bothrops alternatus*.

Fonte: <http://www.herpetofauna.com.br/AcidentesOfidicos.htm>

2.4 ACIDENTES OFÍDICOS

O ofidismo é o maior causador de intoxicações exógenas por animais na América Latina e representa um grave problema de saúde pública devido a frequência com que ocorre. Está diretamente relacionada aos fatores climáticos e ao aumento dos trabalhos humano nas áreas de campo. A faixa etária acometida varia entre 15 a 50 anos, sendo o sexo masculino o mais prevalente (SECRETARIA DE VIGILÂNCIA EM SAÚDE, MS, 2009). Acredita-se que esses acidentes afetem cerca de 2,5 milhões de pessoas por ano em todo mundo, onde 100 mil evoluem para morte (WHITE, 2005).

Dos países sul-americanos, o Brasil é o que representa maior número de acidentes/ano (MEBS, 1981). No ano de 2012 foram notificados pelo Sistema de Informação de Agravos de Notificação (SINAN, 2012) 139.772 acidentes com animais peçonhentos, dentre os quais as serpentes contribuíram com 28.645 dos casos. De acordo com Bochner e Struchiner (2003), desde os trabalhos de Vital Brazil, a média anual é de cerca de 20.000 acidentes ofídicos por ano.

Dos acidentes ofídicos notificados no país em 2012, 71,85% foram causados por serpentes do gênero *Bothrops*, 7,79% por serpentes do gênero *Crotalus*, 3,04% por serpentes do gênero *Lachesis*, 0,83% por serpentes do gênero *Micrurus*, 4,36% por serpentes não peçonhentas e em 12,11% dos casos, a serpente não foi identificada (SINAN, 2012) (fig.6). Isso demonstra a importância epidemiológica do acidente botrópico para o país (FUNASA, 2001).

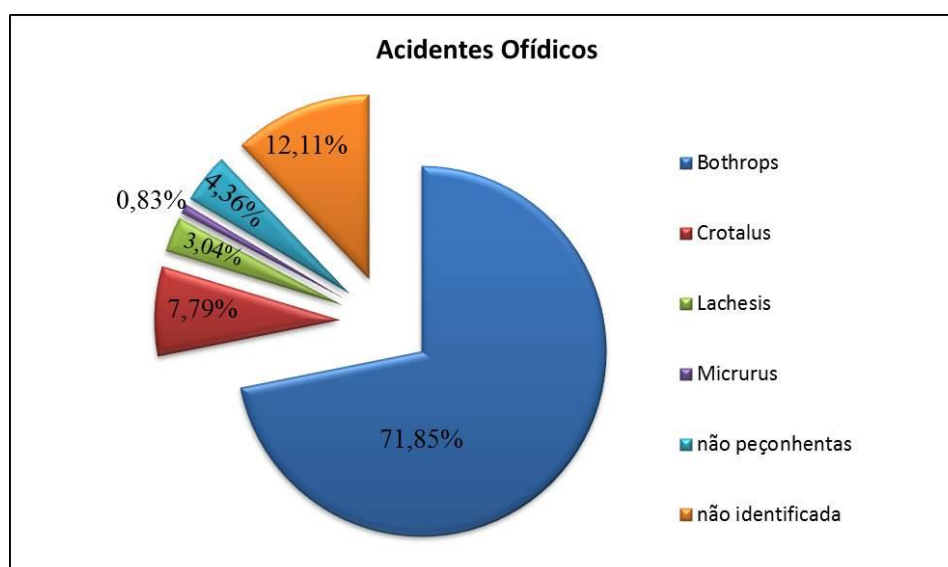


Figura 6: Acidentes ofídicos notificados no Brasil em 2012

Fonte: Adaptado SINAN

O acidente botrópico corresponde ao acidente ofídico de maior incidência no país e pode ser definido por manifestações locais e sistêmicas, sendo os efeitos locais comuns: dor e edema, hemorragia local, formação de bolhas e necrose tecidual. (CARDOSO, 2003; GUTIÉRREZ, 2009a, 2011). A dor local, na maioria das vezes, é imediata e induzida pela liberação de substâncias como a bradicinina e histamina. A formação do edema advém devido ao aumento da permeabilidade vascular e o extravasamento de proteínas. Infecções podem acontecer devido a uma contaminação pela flora bacteriana oral da serpente. A necrose tecidual, provocada pela ação proteolítica da peçonha, associada à lesão vascular, pode resultar em perda irreversível da função ou do tecido, com possibilidade de amputação do membro afetado (BARRAVIERA, 1993; CARDOSO, 2003; PINHO, 2008; STÁBELI, 2006).

As manifestações sistêmicas de maior frequência são a indução do estado de choque, distúrbios na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrintestinais, náuseas, vômitos e hematúria (WARREL, 2004). As causas principais de óbitos devido ao envenenamento botrópico estão ligadas à insuficiência renal aguda, sangramentos em órgãos vitais e choque.

O procedimento terapêutico usado no tratamento de acidentes ofídicos é a soroterapia, que consiste na administração do soro anti-peçonha, específico para cada acidente. Apesar de não ser considerado um tratamento ideal, devido ao fato de não reverter os danos locais provocados pelo envenenamento e poder induzir reações de hipersensibilidade, é o tratamento disponível no mercado (BATTELLINO, 2003; CAMEY, 2002; DA SILVA, 2003; GUTIÉRREZ, 2009a).

2.5 PEÇONHA DE SERPENTES

A principal função da peçonha da serpente é paralisar a presa, além de contribuir para a defesa contra agressores e durante a digestão da presa. A peçonha é produzida por glândulas especializadas e podem apresentar variações na sua composição, diferenciando-se entre espécies ou variações intraespecíficas que são decorrentes de variações sazonais, sexuais, dietéticas, de habitat e idade da serpente (CHIPPAUX, 1991).

A composição da peçonha de serpentes é complexa. Cerca de 90% do seu peso seco é constituída por compostos proteicos, como peptídeos e compostos enzimáticos. Em menor proporção, a fração não proteica da peçonha é formada por compostos orgânicos de pequena massa molecular, como carboidratos, lipídios e aminoácidos livres; e compostos inorgânicos,

como cálcio, ferro, fósforo, magnésio, potássio, sódio e zinco (BJARNASON e FOX, 1994; MARLAND, 1998; MATSUI, 2000; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006).

Encontram-se, na literatura, detalhes de purificação e caracterização de inúmeros componentes com ação farmacológica presentes em peçonhas de serpentes, os quais apresentam diversas atividades biológicas, como as proteases, miotoxinas, fosfolipases A₂, L-aminoácido-oxidases, acetilcolinesterases, nucleotidases, nucleosidases e desintegrinas (MATSUI, 2000, 2010; SWENSON e MARKLAND, 2005). As metaloproteases constituem um grupo de enzima de grande importância para os efeitos locais e sistêmicos observados durante o envenenamento de serpentes botrópicas.

2.6 METALOPROTEASES

As metaloproteases (SVMPs) (do inglês: Snake Venom Metalloproteases) formam um grupo de enzimas que apresentam massa molecular variada e são responsáveis principalmente pelos efeitos hemorrágicos do acidente ofídico, devido a sua ação sobre as proteínas da membrana basal dos capilares (BJARNASON e FOX, 1994). As SVMPs compreendem até 30% das proteínas encontradas em certas peçonhas de viperídeos e desempenha um papel significativo nas patologias associadas ao seu envenenamento (CALVETE, 2007). São enzimas caracterizadas pela dependência catalítica de íons metálicos (Zn^{2+} , Ca^{2+} ou Mg^{2+}) e pela grande diversidade estrutural e funcional (GUTIÉRREZ e RUCAVADO, 2006). Esses íons desempenham um importante papel na atividade proteolítica e, portanto, na atividade biológica dessas proteases (FOX e SERRANO, 2009). Em geral, as SVMPs são zinco dependente, pertencente à família da metzincina. O sítio ligante de zinco dessa família possui uma sequência de aminoácidos conservada, HEBXHXBGBXHZ, constituindo o domínio catalítico metaloprotease, onde H representa a histidina; E, ácido glutâmico; G, glicina; B, um resíduo hidrofóbico; X um aminoácido qualquer e Z um aminoácido diferente entre suas subfamílias, mas conservado entre as mesmas (FOX e SERRANO, 2005; MARKLAND, 1998). A remoção do zinco por agentes quelantes, como o ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) e 1,10-fenantrolina, podem inibir as SVMPs, eliminando completamente sua atividade enzimática (MARKLAND, 1998; MATSUI, 2000).

As SVMPs são classificadas em três classes (P-I- P-III), de acordo com suas massas moleculares e organização de seus multidomínios (FOX e SERRANO, 2008) (fig. 7). O critério para essa classificação foi baseado na presença ou ausência de domínios não proteases através de análises de mRNA e proteínas isoladas da peçonha. A classe P-I inclui as SVMPs

pequenas, com massas moleculares entre 20.000 e 30.000 Daltons, com pouca ou nenhuma atividade hemorrágica. As proteases de 30.000 a 60.000 Daltons compõem a classe P-II, e apresentam um domínio desintegrina adicionado ao C-terminal do domínio catalítico. A classe P-II foi subdividida em P-IIa a P-IIe de acordo com o processamento para liberação do domínio desintegrina. Na subclasse P-IIa o domínio desintegrina é liberado da proteína de forma madura, enquanto na subclasse P-IIb todos os domínios permanecem após maturação da proteína; a subclasse P-IIc compreende as SVMPs diméricas, sem liberação do domínio desintegrina. As proteases da classe P-IId originam as desintegrinas homodiméricas liberadas do restante da proteína por um processo proteolítico pós-traducional, enquanto a subclasse P-IIe origina as desintegrinas heterodiméricas, igualmente processadas do restante da proteína (FOX e SERRANO, 2005, 2008).

As SVMPs classe P-III são as mais intrigantes das categorias de SVMPs, quanto a sua função e contribuição na complexidade da peçonha. A classe P-III compreende as enzimas com massas moleculares entre 60.000 a 100.000 Daltons, que contêm um domínio rico em cisteína, em adição aos domínios metaloprotease e ao domínio semelhante à desintegrinas. O domínio desintegrina-like apresenta dois resíduos de cisteína a mais, quando comparado com as desintegrinas, e, portanto, a disposição de suas pontes dissulfeto é diferente. Além disso, o domínio desintegrina-like não apresenta a sequência RGD (FOX e SERRANO, 2005, 2008).

Assim como a classe P-II, a classe P-III apresenta subclasses. Na subclasse P-IIIa não há liberação dos domínios adicionais após maturação da proteína, enquanto que na subclasse P-IIIb os domínios ricos em cisteína e desintegrina-like são liberados na forma madura da proteína. Na subclasse P-IIIc os precursores originam as SVMPs diméricas sem liberação do domínio rico em cisteína e desintegrina-like. A subclasse P-IIId, anteriormente descrita como P-IV (FOX e SERRANO, 2005; HITE, 1994), inclui proteases que possuem domínios semelhantes à lectina tipo-C ligadas por pontes dissulfeto aos outros três domínios característicos das enzimas P-III (FOX e SERRANO, 2005, 2008).

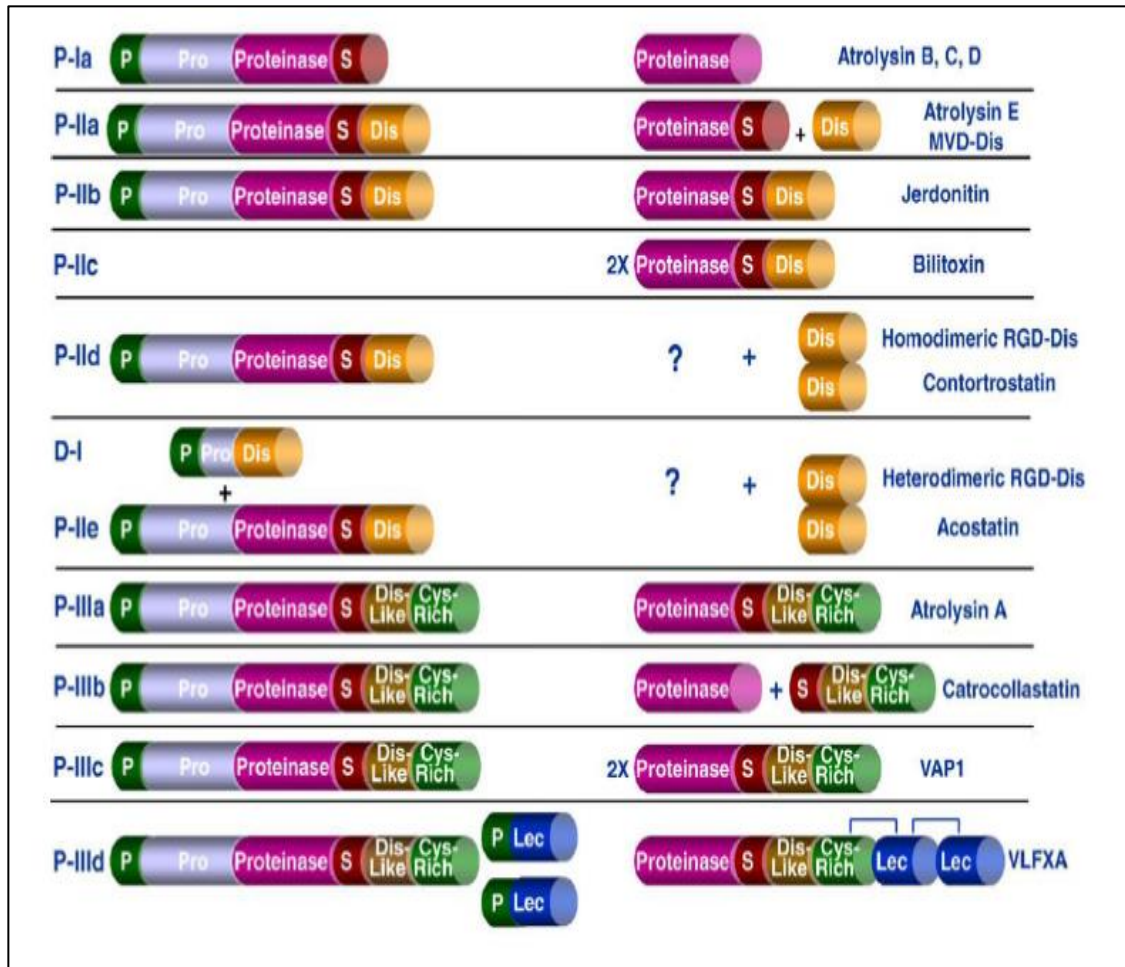


Figura 7: Classificação das SVMPs. P: peptídeo sinalizador; Pro: pró-domínio, removido durante sua ativação; S: sequência HEbXHXbGBXH; Dis: domínio desintegrina; *Dis-like*: domínio semelhante à desintegrina; *Cys-rich*: domínio rico em cisteína; Lec: lectina; (?): produto processado, mas não identificado na peçonha (Fonte: FOX e SERANO, 2008).

As SVMPs são sintetizadas e armazenadas na glândula da serpente na forma de precursores inativos. Elas possuem multidomínios, incluindo um pró-domínio que interage com o domínio catalítico, bloqueando seu sítio ativo por se ligar ao Zn^{2+} , responsável pela inativação das proteases antes da secreção. Após serem secretadas, essas enzimas são ativadas por atividade auto catalítica residual ou pela ação de outras proteases presentes na peçonha (SWENSON e MARKLAND, 2005; RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Os domínios desintegrina e desintegrina-like interagem fortemente com as integrinas, interferindo em processos biológicos mediados por esses receptores. Esses domínios, juntamente com o domínio semelhante à lectina tipo-C e o domínio rico em cisteína, possuem um papel importante nos efeitos tóxicos das SVMPs (JIA, 1997; IBA, 1999; SWENSON, 2005).

As SVMPs têm sido objeto de muito estudo devido à importância que elas apresentam no envenenamento. Desempenham um papel significativo nos efeitos sistêmicos do

envenenamento, principalmente nos distúrbios na hemostasia (FOX e SERRANO, 2009). Em geral, sua ação está relacionada com a proteólise de componentes da matriz extracelular (colágeno tipo IV, laminina, fibronectina), ativação ou degradação de proteínas plasmáticas (fibrina, fibrinogênio, FvW, pró-trombina, fator X) e interação com receptores plaquetários (integrinas e GPs). Esses efeitos promovem diversas alterações patológicas, tais como hemorragia, inibição da agregação plaquetária, efeito antitumoral, mionecrose, edema, e resposta inflamatória (GUTIÉRREZ, 2005; WHITE, 2005; MOURA-DA-SILVA, 2007).

Todas as classes de SVMPs são capazes de provocar hemorragia, entretanto, diversos estudos demonstram que a presença dos domínios não enzimáticos direciona e potencializa esse efeito. Esses domínios se associam aos componentes da membrana basal e integrinas de células endoteliais, posicionando o domínio catalítico em uma posição favorável à proteólise e ruptura da microvasculatura (SERRANO, 2006; MOURA-DA-SILVA, 2008). Contudo, encontra-se na literatura SVMPs de classe P-III que não apresentam atividade hemorrágica, como o ativador de protrombina Berythraactivase da peçonha de *B. erythromelas* (SILVA, 2003). SVMPs de classe P-I podem provocar hemorragia local por mecanismos indiretos, como lesão tecidual, e as SVMPs de classe P-III, geralmente, contribuem com a hemorragia sistêmica (GUTIÉRREZ, 2009b).

A capacidade das metaloprotease/desintegrinas se ligarem à integrinas de membranas afeta vários processos celulares como agregação plaquetária, angiogênese, metástase, crescimento tumoral e a interação de células normais e malignas com os componentes da matriz extracelular (SWENSON, 2007). Acredita-se que o efeito inibitório da agregação plaquetária provocado pelas SVMPs ocorra, principalmente, devido à interação de sítios específicos das SVMPs com receptores plaquetários (integrinas $\alpha 2\beta 1$, $\alpha \text{IIb}\beta 3$, GPVI e GPIb) e hidrólise de FvW. A hidrólise de proteínas da matriz extracelular (colágeno e fatores de coagulação) exerce um efeito secundário sobre a inibição plaquetária (KAMIGUTI, 2005; DU, 2006). Estudos mostraram que a ligação de desintegrinas-RGD à integrina $\alpha \text{IIb}\beta 3$ bloqueia sua interação com o fibrinogênio, impedindo a agregação plaquetária induzida por ADP, colágeno, ácido araquidônico, entre outros agonistas, contribuindo para os sintomas hemorrágicos do envenenamento (KAUSKOT, 2008). A ligação de desintegrinas-RGD ao receptor de vitronectina, $\alpha \text{V}\beta 3$, induz apoptose de células endoteliais por bloquear sua adesão à proteínas da matriz extracelular, também contribuindo para os sintomas hemorrágicos (HONG, 2003). As desintegrina-like também são capazes de inibir a agregação plaquetária, entretanto o efeito ocorre através da inibição da integrina $\alpha 2\beta 1$, principal receptor para o colágeno (SHIMOKAWA, 1997).

Diversos fármacos antiplaquetários derivados de toxinas de peçonhas de serpentes estão em avanço clínico. O Eptifibatide é um exemplo de fármaco utilizado no tratamento de trombose e outras doenças cardiovasculares. Trata-se de um peptídeo cíclico baseado na sequência KGD da desintegrina Barbourin purificada da peçonha da serpente *Sistrurus miliarius barbouri*. O Eptifibatide bloqueia especificamente a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (SCARBOROUGH, 1991).

Algumas desintegrinas também possuem atividade antitumoral por ser capaz de inibir a migração celular de tumores, a metástase e a angiogênese dependentes de integrinas. Resíduos adjacentes à sequência RGD (ou outra), a estrutura tridimensional, a estrutura da região C-terminal e o padrão de pontes dissulfeto das desintegrinas parecem interferir com a especificidade de ligação dessas moléculas às integrinas (COMINETTI, 2004).

A adesão mediada por integrinas é crucial para a metástase de tumores. As interações entre células tumorais e plaquetas podem contribuir para etapas críticas na cascata metastática, uma vez que as plaquetas facilitam a adesão e retenção das células tumorais na parede do vaso sanguíneo sob condições de cisalhamento relativamente altas. Essas interações são mediadas por GPIIb-IIIa plaquetária e integrinas αV nas células tumorais independentemente da natureza da subunidade β , como por exemplo, integrinas $\alpha\text{V}\beta 3$ expressas em células de câncer de mama agressivo (FELDING-HABERMANN, 2003).

Há, na literatura, diversos relatos de metaloprotease/desintegrinas derivadas de peçonhas de serpentes que apresentam capacidade de inibir a adesão, migração, proliferação e progressão do câncer *in vivo* (RÁDIS-BAPTISTA, 2005). A desintegrina Contortrostatin, por exemplo, inibe a disseminação do câncer de ovário humano. Essa desintegrina é capaz de bloquear a adesão das células da linhagem OVCAR-5 e inibir a invasão das células tumorais (MARKLAND, 2001). Outro exemplo de desintegrina é a Rhodostomin, que pode inibir a adesão, migração e invasão de células de carcinoma de mama e próstata. Essa proteína inibe especificamente a ligação de anticorpos monoclonais (MoAb) 7E3, que reconhecem a integrina $\alpha\text{v}\beta 3$ para as células tumorais (YANG, 2005). Resultados promissores foram apresentados por Zhu (2010) referentes à recombinante da Jerdonitin, uma SVMP PII da peçonha da serpente *Trimeresurus jerdonii*. Essa SVMP recombinante apresenta capacidade de inibição do crescimento de várias linhagens de células tumorais humanas, incluindo de câncer de fígado (Bel7402), de leucemia (K562) e de carcinoma gástrico (BGC823).

A interferência de toxinas presentes em peçonhas de serpentes ocorre, muitas vezes, devido às características únicas de atividade enzimática, estrutura e ligação. Em suma, as toxinas, tais como as metaloprotease/desintegrinas de peçonhas de serpentes são ferramentas

importantes para estudos básicos de hemostasia, principalmente relativos à função plaquetária e de desenvolvimento e metástase de células tumorais, bem como apresentam potencial terapêutico. Certamente, o avanço nas investigações sobre a constituição bioquímica das peçonhas conduzirá a descobertas promissoras para a terapêutica antiplaquetária (antitrombótica) e antitumoral.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Purificar, identificar e caracterizar bioquimicamente uma proteína presente na peçonha da serpente *Bothrops alternatus*.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Fracionar a peçonha bruta de *B. alternatus*;
- Purificar e caracterizar bioquimicamente a proteína quanto a determinação de sua massa molecular, pI e N-terminal;
- Caracterizar os principais efeitos biológico-enzimáticos causados pela proteína purificada, tais como: atividades proteolítica, coagulante, anticoagulante e hemorrágica;
- Avaliar a interferência da proteína purificada sobre a agregação plaquetária em plasma humano;
- Avaliar a atividade citotóxica e antitumoral da proteína purificada sobre as células HeLa.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 OBTENÇÃO DA PEÇONHA

A peçonha de *B. alternatus* foi adquirida do Serpentário Bioagents, Batatais/SP, sob responsabilidade do biólogo Luiz Henrique Anzaloni Pedrosa. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada à vácuo, em temperatura ambiente, e conservada a -20 °C até o momento do uso.

4.2 ANIMAIS

Camundongos machos Swiss (20-25g) foram mantidos em condições controladas de temperatura ($22 \pm 2^\circ\text{C}$), umidade relativa (60-70%), ciclo automático claro/escuro (12 horas) e com livre acesso à água e ração. Os experimentos foram realizados em conformidade com as diretrizes atuais para os cuidados de animais de laboratório e as orientações éticas para investigações com consciência animal, estabelecidas pelo Comitê de Ética na Utilização de Animais da Universidade Federal de Uberlândia (CEUA/UFU), Minas Gerais, Brasil (Protocolo nº 028/09).

4.3 OBTENÇÃO DO SANGUE HUMANO

A obtenção do sangue humano foi realizada em conformidade com as diretrizes atuais para investigações com seres humanos, estabelecidas pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (CEP/UFU), Minas Gerais, Brasil (Protocolo nº 055/11).

4.4 DETERMINAÇÃO QUANTITATIVA DE PROTEÍNAS

Para determinação quantitativa de proteínas, alíquotas de 1mL da solução contendo a proteína foram submetidas à dosagem em espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Japão) através do método de análise de proteínas. Nesse método, as amostras são lidas a um comprimento de onda Ultra Violeta (U.V) de 280nm e comparadas a um solução branca (sem proteínas). O software desse equipamento mostra a quantidade de proteínas na amostra apresentada em mg/mL.

4.5 PURIFICAÇÃO DA BOTHALTERNINA

4.5.1 Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de *B. alternatus*

O fracionamento da peçonha bruta de *B. alternatus* foi realizado conforme as técnicas descritas por OLIVEIRA (2001) com algumas modificações. Cerca de 300mg da peçonha bruta foram dissolvidos em 4,0mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05M, pH=7,8, centrifugados a 10.000g por 10 minutos à temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de cromatografia (2,5 x 20cm) contendo a resina DEAE Sephacel. As amostras foram eluídas em gradiente de concentração de AMBIC (0,05M – 0,6M), utilizando uma câmara de mistura com volume de 150mL. As frações, contendo 3,0mL cada, foram coletadas em um fluxo de 20,0mL/hora por um coletor de frações (Bio Rad - modelo 2110, EUA). A absorbância de cada fração foi acompanhada à 280nm em um espectrofotômetro (BioSpec-mini, Shimadzu Biotech, Japão). Em seguida, o gráfico foi construído, as amostras delimitadas, reunidas em ‘pools’, dosadas, liofilizadas e armazenadas à -20°C. A oitava fração (A8) foi submetida a outro passo de purificação.

4.5.2 Cromatografia de fase reversa da fração A8

A fração A8 foi submetida a um segundo passo de purificação em coluna de fase reversa C₂/C₁₈ (4,6 x 100 mm), utilizando o sistema de HPLC ÄKTApurifier™. A coluna foi equilibrada com solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético) e eluída com um gradiente linear de concentração de 0 a 100% de solvente B (70% de acetonitrila, ácido trifluoroacético a 0,1%) a um fluxo de 0,3 mL / min. A absorbância foi monitorada a 280 nm. A principal fração obtida por esse procedimento foi denominada de Bothalternina.

4.6 ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA COM AGENTES DESNATURANTES

A eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS-PAGE), foi realizada conforme a técnica descrita por Laemmli (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5% em pH=6,8, contendo Tris-HCl 0,125M e SDS 0,1% e um gel de separação a 14% em pH=8,8 e SDS 0,1%, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

Amostras de proteínas foram dissolvidas em tampão Tris-HCl 0,0625M, pH=6,8, contendo 10% (m/v) de β -mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol, 0,2% (m/v) de SDS e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol como corante. As amostras preparadas foram aquecidas durante 3 a 5 minutos em água fervente. Em seguida, cerca de 5 a 30 μ L de amostra foram aplicados no gel. Paralelamente, foi aplicado no gel o padrão de massa molecular LMW (Low Molecular Weight) — fosforilase b (97 kDa), albumina bovina (66 kDa), ovoalbumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa), dissolvido no mesmo tampão.

As proteínas e os géis foram corados por 15 minutos em uma solução de Coomassie Blue R-250 a 0,2% (m/v) dissolvido em água: metanol: ácido acético (4:5:1 v/v). Os géis foram descorados em uma solução contendo água: etanol: ácido acético (6:3:1 v/v).

4.7 DETERMINAÇÃO DO PONTO ISOELÉTRICO

Para a determinação do ponto isoelétrico (pI) da Bothalernina, foi empregada a técnica de eletroforese 2D. Esta técnica consiste em duas etapas: Focalização isoelétrica e SDS-PAGE respectivamente. Na primeira, a proteína é colocada em contato com uma fita de 7cm e valores de pH variando entre três a dez de forma linear. Esta fita contém gel de poliacrilamida desidratado em um lado de sua superfície, onde o gradiente de pH é formado pela presença de anfólitos (GE, 2004). Para a re-hidratação das fitas, aplicou-se 130 μ L de amostra [15 μ g de proteínas solubilizadas em uma solução de re-hidratação (7M de ureia, 2M de thiourea, 2% de Triton X-100, 1% de IPG Buffer, 0,002% de bromophenol blue)] em uma canaleta do aparato sobre o qual as fitas foram colocadas. O gel presente na fita foi reidratado a temperatura ambiente por cerca de 12 horas. Após este período, levou-se a fita ao sistema focalizador (EttanIPGphor III, GE Healthcare) nas seguintes condições: (1) passo de 300 V até acúmulo de 200Vh, (2) gradiente de 300 a 1000V até acúmulo de 300 Vh, (3) gradiente de 1000 a 5000V até acúmulo de 4000Vh e (4) passo de 5000V até acúmulo de 1250Vh (GE, 2004). Em média, a focalização foi executada em três horas. Ao término da focalização, as fitas foram equilibradas em duas etapas. Na primeira delas, conhecida como etapa de redução, utilizou-se 5mL de uma solução contendo 6mol.L⁻¹ de ureia, 2% de SDS (m/v), 30% de glicerol (v/v), 50mmol.L⁻¹ de Tris-HCl a 1,5 mol.L⁻¹ (pH=8,8), 0,002% de azul de bromofenol e 1% de DTT (m/v). Na segunda etapa, conhecida como alquilação, utilizou-se a mesma solução, porém, neste caso, substituiu-se o DTT por 2,5% de iodoacetamida (m/v) (GE,

2004). Cada etapa de equilíbrio da fita foi executada por 15 minutos, sob leve agitação. Em seguida, iniciou-se a segunda etapa da eletroforese 2D, a SDS-PAGE. Nesse caso, aplicou-se a fita em gel de poliacrilamida a 12,5% previamente preparado em placa de 100 x 100 x 1,0mm. Adicionou-se sob um pequeno pedaço de papel de filtro, 10µL de padrão de massa molecular. Após ser acomodada apropriadamente cada fita e o padrão sob o gel de poliacrilamida, foi adicionada uma solução aquecida (ca. 40°C) de 0,5% de agarose (m/v). A separação das proteínas, de acordo com a massa molecular, foi realizada aplicando-se 25mA por gel e 100W durante aproximadamente duas horas.

4.8 COLORAÇÃO E DESCOLORAÇÃO

O gel foi corado por imersão em solução de Coomassie Blue R-250 a 0,25% em ácido acético, etanol, água destilada na proporção de 1:5:5 (v/v/v), durante 20 minutos sob agitação. A descoloração do gel foi feita por imersão em solução de etanol, ácido acético, água destilada na proporção de 1:2:20 (v/v/v), durante 3 horas. Várias trocas desta solução foram efetuadas durante este período.

4.9 SEQUENCIAMENTO N- TERMINAL

O sequenciamento da Bothalternina foi realizado em microsequenciador automático PPSQ-33A (Shimadzu), o qual utiliza o processo químico de sequenciamento por clivagem N-terminal, derivado do método desenvolvido por Pehr Edman conforme descrito por Gray (1972).

4.10 ATIVIDADE PROTEOLÍTICA SOBRE A CASEÍNA

Amostras de 20µg de Bothalternina foram adicionadas a 200µL de solução salina e incubada por 60 minutos com 800µL de solução azocaseína (1mg/mL). A reação foi parada pela adição de 200µL de ácido tricloroacético a 15% para precipitar a azocaseína não degradada. A mistura foi deixada em repouso por 20 minutos, depois foi centrifugada a 10.000xg por 10 minutos. A atividade proteolítica foi estimada por meio da leitura da absorbância do sobrenadante a 405nm. Uma unidade de atividade azocaseinolítica foi definida como a quantidade de enzima que produz um aumento de 0,01 unidades de absorbância.

4.11 ATIVIDADE FIBRINOGENOLÍTICA

A atividade proteolítica sobre o fibrinogênio bovino foi realizada como descrito por Rodrigues et al. (2000), com algumas modificações. Amostras de 25µL de solução de fibrinogênio (3mg/mL salina) foram incubadas com 10µg de Bothalernina a 37°C por diferentes intervalos de tempo (0, 15, 30, 60 e 120 minutos). A reação foi interrompida pela adição de 25µL de Tris-HCl 0,0625M, pH=6,8, contendo 10% (m/v) de β-mercaptoetanol, 10% (v/v) de glicerol, 0,2% (m/v) de SDS e 0,001% (m/v) de azul de bromofenol como corante. Os produtos da reação foram analisados em SDS-PAGE 14%.

4.12 ATIVIDADE COAGULANTE

A atividade coagulante foi ensaiada utilizando plasma bovino. As amostras de plasma foram misturadas com citrato de sódio a 3,8% (9:1, v/v) e centrifugadas a 2500xg durante 15 minutos para obter plasma rico em plaquetas (PRP). Bothalernina (25µg/25mL) ou o mesmo volume de solução salina (controle negativo) ou 0,2mol/L de cloreto de cálcio (controle positivo) foi adicionado a 200µL de PRP bovino citratado a 37°C. Atividade de coagulação foi determinada através da medição do tempo até aparecimento de coágulos de fibrina por um coagulômetro (CLO timer).

4.13 ATIVIDADE ANTICOAGULANTE

O ensaio anticoagulante *in vivo* foi realizado segundo o método descrito por Gene et al. (1989), com algumas modificações. Cerca de 50µg da Bothalernina em solução salina estéril (volume final de 100µL) foram injetados via intraperitoneal em camundongos Swiss machos (n=3). O mesmo volume de solução salina estéril foi injetado no grupo de animais pertencentes ao grupo controle negativo. Após uma hora, os animais foram sacrificados com o aprofundamento de anestesia (cetamina/xilazina) e o sangue foi coletado por punção cardíaca. O sangue foi colocado em tubos de ensaio e mantidos à 25-30°C até que ocorresse a formação de um coágulo visível macroscopicamente. A atividade foi determinada medindo-se o tempo de coagulação do sangue.

4.14 ATIVIDADE HEMORRÁGICA

A atividade hemorrágica foi realizada conforme a metodologia descrita por Nikai *et al.* (1984) com algumas modificações. 50µg da Bothalernina, diluída em solução salina estéril (volume final de 100µL), foram injetados por via subcutânea no dorso de camundongos Swiss machos (n=3). O grupo de animais controle recebeu somente a injeção de 100µL de solução salina estéril. Após 3 horas, os animais foram sacrificados com o aprofundamento de anestesia (cetamina/xilazina), as peles foram removidas. A presença de halos hemorrágicos na face interna da pele era indicativa de hemorragia.

4.15 ENSAIO DE INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

O plasma rico em plaquetas (PRP) foi preparado como descrito por Sanchez *et al.* (2007), com algumas modificações. O sangue humano coletado na presença de citrato de sódio foi centrifugado a 100g durante 12 minutos a temperatura ambiente. O plasma pobre em plaquetas (PPP) foi obtido nas mesmas condições, porém a centrifugação foi realizada a 1000g por 15 minutos. A agregação foi medida utilizando o Agregômetro automático de quatro canais (AggRAMTM versão 1.1, Helena Laboratories, EUA). Os ensaios de inibição da agregação plaquetária foram realizados a 37°C em cubeta de vidro siliconizada, usando 200µL de PRP, mantidos sob agitação constante. A Bothalernina (25µg) foi adicionada ao PRP e, em seguida, foram adicionados os seguintes agonistas plaquetários: ADP (20µM), ristocetina (15µM) e epinefrina (300µM). Experimentos controle foram realizados usando apenas agonistas plaquetários. Os ensaios foram realizados em triplicatas.

4.16 AVALIAÇÃO *in vitro* DO EFEITO ANTITUMORAL DA Bothalernina

4.16.1 CULTURA DE CÉLULAS HELA

Células derivadas do carcinoma de colo uterino humano (linhagem HeLa) foram mantidas em cultura no Laboratório de Biologia Molecular da Universidade Federal de Uberlândia. As células foram cultivadas em meio RPMI 1640 suplementado com HEPES (25 mM), penicilina G (100U/mL), estreptomicina (100µg/mL), L-glutamina (2mM), bicarbonato de sódio (3mM) e soro fetal bovino (SFB) a 10% (RPMI completo) em atmosfera úmida de 5% CO₂ a 37°C.

4.16.2 TRATAMENTO DE CÉLULAS HeLa PELA BOTHALTERNINA

As células HeLa foram adicionadas em placas de cultura celular de 96 poços na concentração de 2×10^4 células/poço/200 μ L e incubadas a 37°C e 5% de CO₂ por 24 horas. Após lavagem com meio RPMI, diferentes concentrações da Bothalternina (2 μ g- 10 μ g) foram adicionados e incubados por quatro horas a 37°C e 5% de CO₂. Como grupo controle (não tratadas) foi adicionado somente meio RPMI completo. A viabilidade celular foi determinada, diretamente, pela análise de MTT. Dois experimentos independentes foram realizados em triplicata.

4.16.3 ANÁLISE DE MTT

A função mitocondrial de células HeLa tratadas com a Bothalternina e controle foi avaliada utilizando-se o método de conversão do azul de tiazolil (MTT), como descrito por MOSMANN (1983). Em resumo, as células foram lavadas com meio RPMI e adicionadas de 0,5mg/mL MTT (Sigma Chemical Co., St. Louis, EUA) em meio RPMI completo, em triplicata, e aguardado quatro horas. O sobrenadante foi removido e as partículas insolúveis de coloração roxa produzida pelas células viáveis, que metabolizaram o MTT, foram, então, solubilizadas com 10% de duodecil sulfato de sódio (SDS) e 50% N, N-dimetil formamida. Após 30 minutos de incubação sob agitação, a densidade óptica (DO) foi determinada a 570nm em leitor de placas (Titertek Multiskan Plus, Flow Laboratories, McLean, EUA).

4.16.4 IMUNOCITOQUÍMICA

A técnica de imunocitoquímica foi utilizada para identificar a expressão de caspase-3 pelas células e tem como fundamento a utilização de anticorpos específicos contra a proteína que se pretende encontrar. Primeiramente, as células são fixadas em uma solução tampão PBS (Phosphate buffered saline) contendo 10% Formaldeído durante dez minutos à temperatura ambiente. Depois, as células são lavadas com PBS 0,1M, por duas vezes. Para o bloqueio, foi acrescentada ao poço uma solução de PBS com glicina (100mM), BSA 3% (albumina sérica bovina) e 0,3% Tween-20. A placa foi incubada durante 20 minutos à temperatura ambiente. A marcação com anticorpo primário foi realizada adicionando sobre as células uma solução de anticorpo primário diluída em solução de bloqueio (1:200) e incubada durante três 3 horas à temperatura ambiente. Em seguida, o PBS foi usado para limpeza do anticorpo não ligado

especificamente ao antígeno. Para a segunda marcação, o anticorpo secundário foi adicionado em solução de bloqueio (1:200) e incubada durante uma hora, a temperatura ambiente. A lavagem com PBS (0.1% Triton) foi repetida por três vezes. E por fim, foi acrescentado glicerol/PBS na proporção de 1:1 na placa juntamente com DAPI, um corante para DNA. Os poços foram observados ao microscópio de fluorescência.

4.17 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

As análises estatísticas foram realizadas pelo teste ANOVA no programa GraphPad Prism, versão 5.01. As diferenças foram consideradas estatisticamente significativas quando $p < 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 PURIFICAÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA BOTHALTERNINA

No presente trabalho, uma toxina da serpente *B. alternatus*, denominada de Bothalternina, foi purificada por duas etapas cromatográficas: uma cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel), seguida por uma fase reversa C₂/C₁₈. O fracionamento da peçonha bruta em resina de troca iônica resultou em oito frações principais, denominadas de A1 a A8. O perfil cromatográfico está mostrado na fig.08.

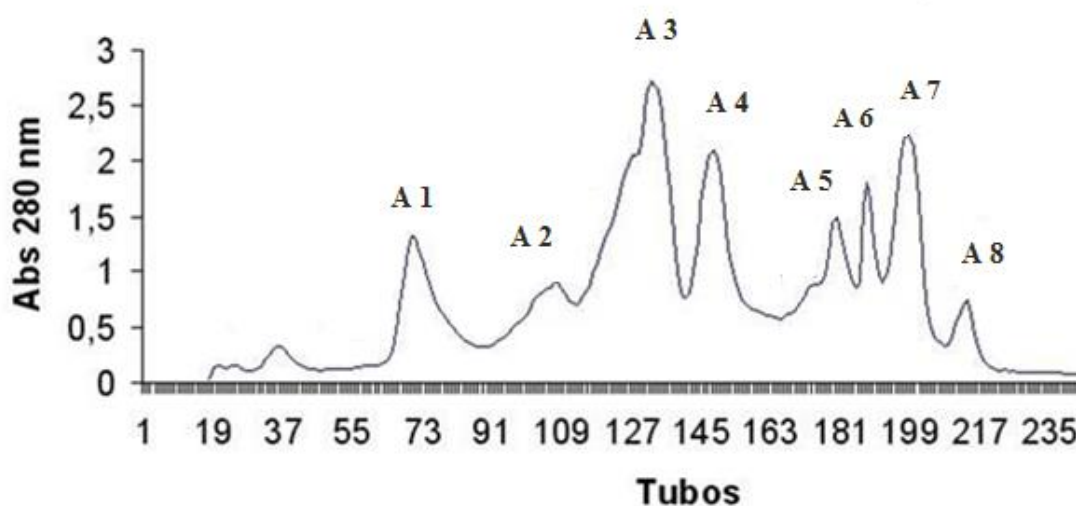


Figura 8: Fracionamento de 300mg da peçonha bruta de *Bothrops alternatus* em coluna de DEAE Sephacel (2,5 X 20 cm), equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05M, pH7,8. As amostras foram eluídas num gradiente convexo de concentração (0,05M – 0,6M) do mesmo tampão. O gradiente foi estabelecido a partir do início da cromatografia.

As frações obtidas a partir dessa cromatografia foram submetidas à eletroforese em gel de Poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes. A análise do perfil eletroforético mostrou que as frações apresentam várias bandas proteicas com massas moleculares variando entre 14.000 e 100.000 Da (resultados não mostrados).

A fração A8 apresentou um grau de pureza elevado e, portanto, após ser reunida em *pool*, liofilizada e ressuspendida, foi submetida ao próximo passo de purificação em coluna de

fase reversa C_2/C_{18} . Esse procedimento resultou em duas subfrações principais. O perfil cromatográfico está mostrado na figura 9.

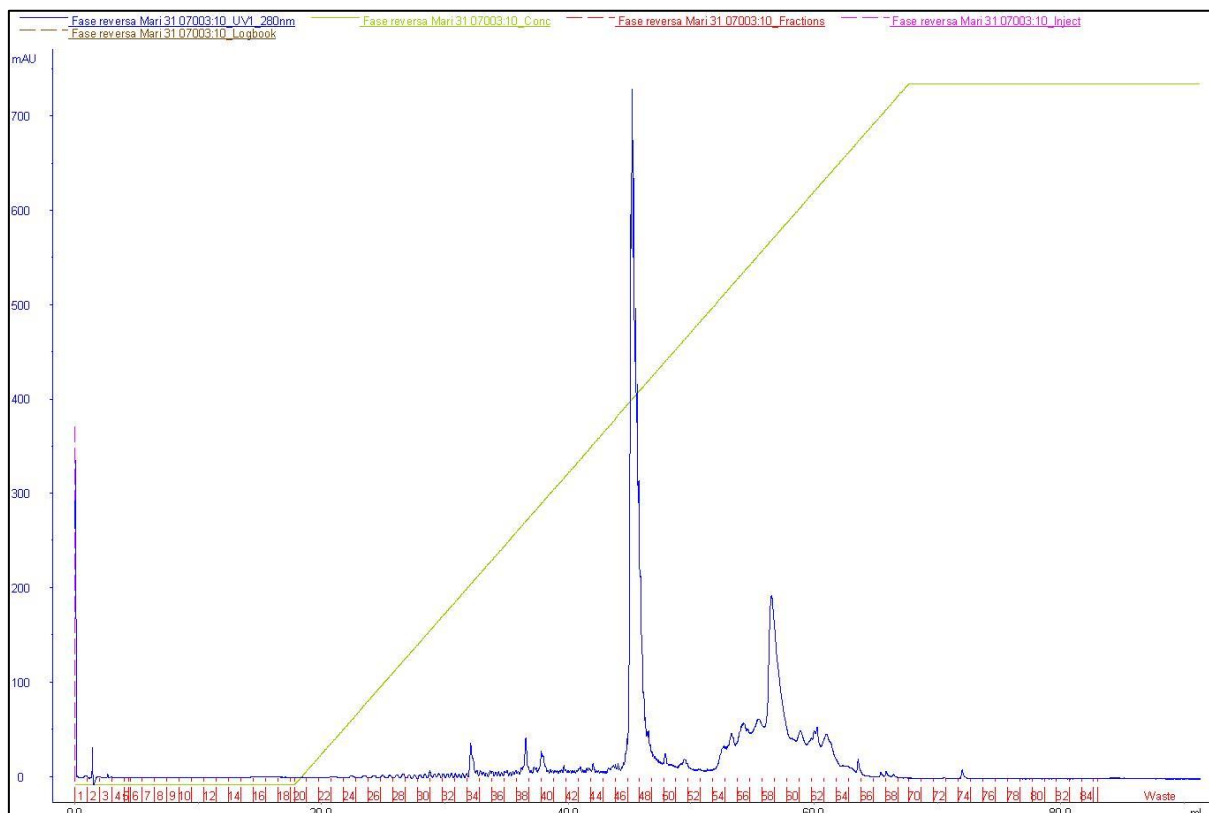


Figura 9: Cromatografia da fração A8 em coluna C_2/C_{18} (4,6 x 100 mm), utilizando o sistema de HPLC ÄKTApurifier™, equilibrada com solvente A (0,1% de ácido trifluoroacético) e eluída com um gradiente linear de concentração de 0 a 100% de solvente B (70% de acetonitrila, ácido trifluoroacético a 0,1%) em um fluxo de 0,3 mL / min. A absorbância foi monitorada a 280 nm.

A primeira subfração, resultante do segundo passo cromatográfico, quando analisada por eletroforese em gel de Poliacrilamida a 14%, apresentou banda única com massa molecular aparente de 32kDa, na presença ou ausência de agentes redutores (fig. 10). Esta subfração foi denominada de Bothalternina e foi utilizada para atingir os objetivos do presente trabalho. A Bothalternina também foi analisada por eletroforese bidimensional e apresentou um pI igual a 4.6 (resultado não mostrado).

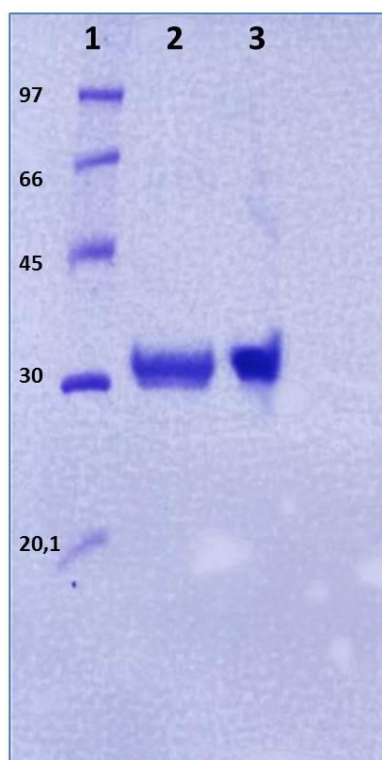


Figura 10: Eletroforese em gel de poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes para a determinação do massa molecular da Bothalternina. 1 – Padrão de massa molecular LMW (Low Molecular Weight): fosforilase b (97.000 Da), albumina bovina (66.000 Da), ovoalbumina (45.000 Da), anidrase carbônica (30.000 Da), inibidor de tripsina (20.100 Da) e α -lactoalbumina (14.400 Da); 2 – Bothalternina reduzida; 3- Bothalternina não reduzida.

A caseína e o fibrinogênio bovino foram utilizados como substratos para avaliar a atividade proteolítica da Bothalternina. Entretanto, a Bothalternina não apresentou efeito proteolítico. Da mesma forma, a toxina purificada não apresentou atividade coagulante, anticoagulante ou hemorrágica.

A sequência N-terminal da Bothalternina foi determinada pela degradação de Edman. Os primeiros 33 resíduos de aminoácidos foram IISPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDA. Quando submetidos ao banco de dados (BLAST), a sequência primária apresentou identidade com outras SVMPs da classe PIII, como por exemplo: Jararhagin-C (USAMI, 1994), Bothropasina (MANDELBAUM, 1982), Jararagina (PAINE, 1992), Jarastatin (COELHO, 1999), Leucurolysin-B (SANCHEZ, 2007), Leucurogin (HIGUCHI, 2011) Brevilysin-H6 (TERADA, 1991), Atrolysin-A (BJARNASON E TU, 1978), e Salmosin (KANG, 1998) (fig. 11).

Majority	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																
	410	420	430	440	450	460	470	480									
Bothalaternina	--II SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDA																33
Leucurogin	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGECGHGDCEQCKFTKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																82
Jararhagin-C	--II SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																78
VAP2A	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																475
VMP-III	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																475
Jararhagin	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																437
VAP2B	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																475
BITM06A	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																476
Brevilysin H6	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRSMSECDPAEHCTGQ																476
Bothropasin	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																476
Acutolysin	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHKGCEQCKFRTSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																475
Acurhagin	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFRTSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																476
Salmosin5	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHGDCEQCKFSKSGTECRSMSECDPAEHCSGQ																93
Alternagin	--II SPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDAATCKLKSQSGQCGHXDCEQCKFTKSGTECRASMSECDPAEHCTGQ																78
Brevilysin H2b	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGSPENCQNECCDAATCKLTSGSQCAKGLCCDQCKFSKSGTECRAAKDDCDIAESCTGQ																289
Brevilysin H2a	TDII SPPVCGNELLEVGEEDCGSPENCQNECCDAATCKLTSGSQCAKGLCCDQCKFSKSGTECRAAKDDCDIAESCTGQ																289

Figura 11: Alinhamento da sequência de Bothalternina e de outras SVMPs: Jararhagin-C (USAMI, 1994), Bothropasina (MANDELBAUM, 1982), Jararagina (PAINE, 1992), Jarastatin (COELHO, 1999), Leucurolysin-B (SANCHEZ, 2007), Leucurogin (HIGUCHI, 2011) Brevilysin-H6 (TERADA, 1991), Atrolysin-A (BJARNASON E TU, 1978), e Salmosin (KANG, 1998).

5.2 AVALIAÇÃO DO EFEITO DA BOTHALTERNINA SOBRE A INIBIÇÃO DA AGREGAÇÃO PLAQUETÁRIA

Neste trabalho, a Bothalternina também foi testada quanto ao seu efeito sobre a agregação plaquetária em plasma humano. A toxina foi capaz de inibir cerca de 58% da agregação de plaquetas induzida pela ristocetina (fig 12A), e cerca de 30% da agregação quando induzida pelo ADP (fig. 12B). Por outro lado, a toxina não inibiu a agregação plaquetária induzida por epinefrina (fig. 12C).

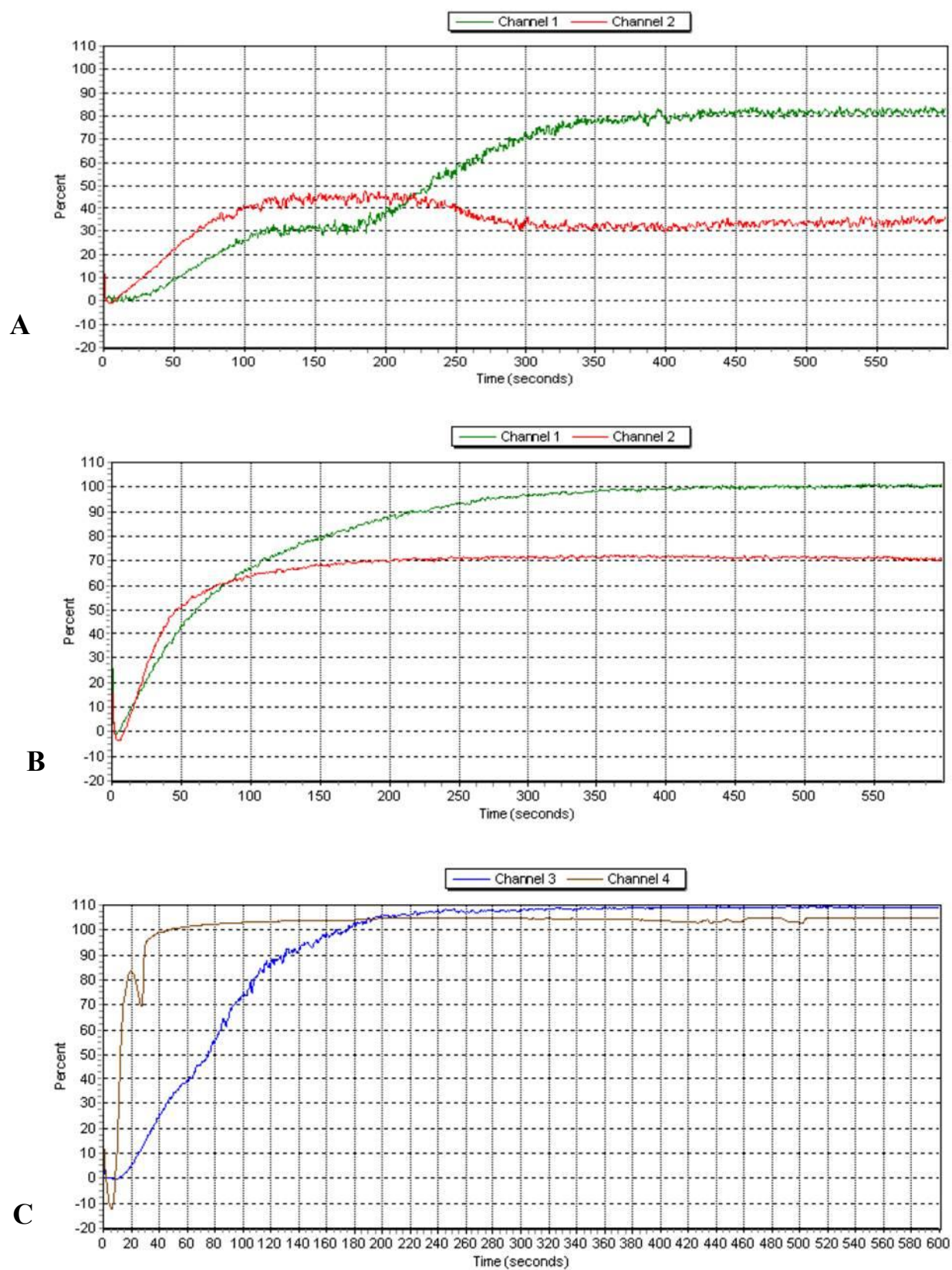


Figura 12: Inibição da agregação plaquetária pela Bothalernina induzida por (A) ristocetina; (B) ADP e (C) epinefrina. Curva verde e marrom: controle da agregação plaquetária induzida pelo agonista. Curva vermelha e azul: inibição da agregação plaquetária por 25 μ g de Bothalernina.

5.3 AVALIAÇÃO IN VITRO DO EFEITO CITOTÓXICO E ANTITUMORAL DA BOTHALTERNINA

A viabilidade celular foi avaliada com base na citotoxicidade da Bothalternina sobre as células HeLa, utilizando o método colorimétrico de MTT e a técnica de Imunocitoquímica. Primeiramente, as populações celulares foram incubadas durante um período de 24h com 10 μ g de Bothalternina e 10 μ g de Peçonha Bruta de *B. alternatus* (fig. 13A). A figuras 13B mostra que a Bothalternina inibe o crescimento das células HeLa até mesmo em concentrações pequenas (2 μ g).

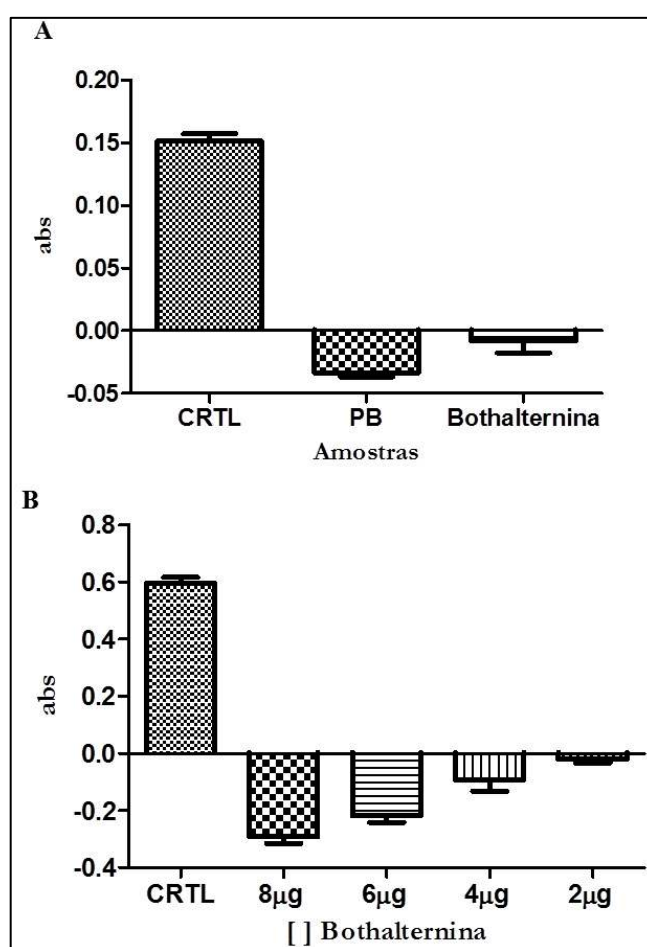


Figura 13: **A:** Exposição das células HeLa a ação da peçonha bruta de *B. alternatus* (10 μ g) e da Bothalternina (10 μ g) . **B:** Exposição das células HeLa a ação de diferentes doses da Bothalternina (2 a 8 μ g). Os resultados foram apresentados como média \pm erro-padrão de dois ensaios independentes realizados em triplicata.

As microscopias de imunofluorescência (fig. 14, 15 e 16) mostram que tanto a peçonha bruta de *B. alternatus* como a Bothalternina foram capazes de inibir drasticamente o crescimento das células tumorais HeLa, mesmo em baixas concentrações (10ng).

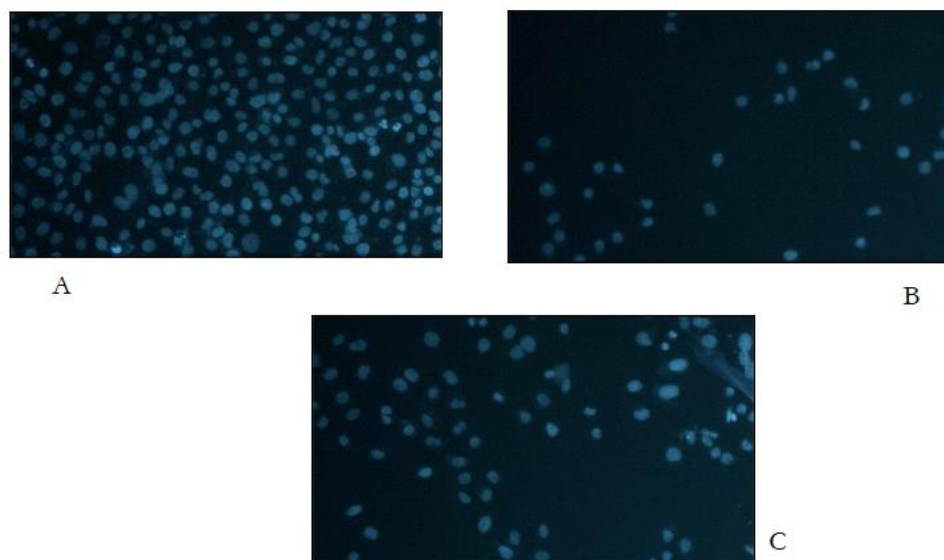


Figura 14: Células HeLa marcadas com anticorpo nuclear DAPI para análise do efeito da peçonha bruta e da Bothalternina. Concentração utilizada 10ng por poço. A: Controle, B: Células tratadas com peçonha bruta de *B. alternatus*; C: Células tratadas com Bothalternina.

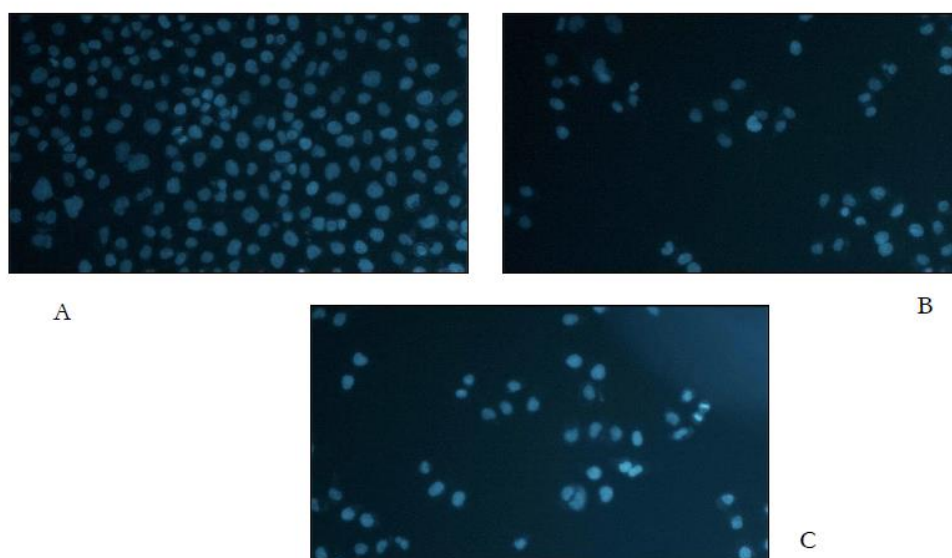


Figura 15: Células HeLa marcadas com anticorpo nuclear DAPI para análise do efeito da peçonha bruta e da Bothalternina. Concentração utilizada 100ng por poço. A: Controle, B: Células tratadas com peçonha bruta de *B. alternatus*; C: Células tratadas com Bothalternina.

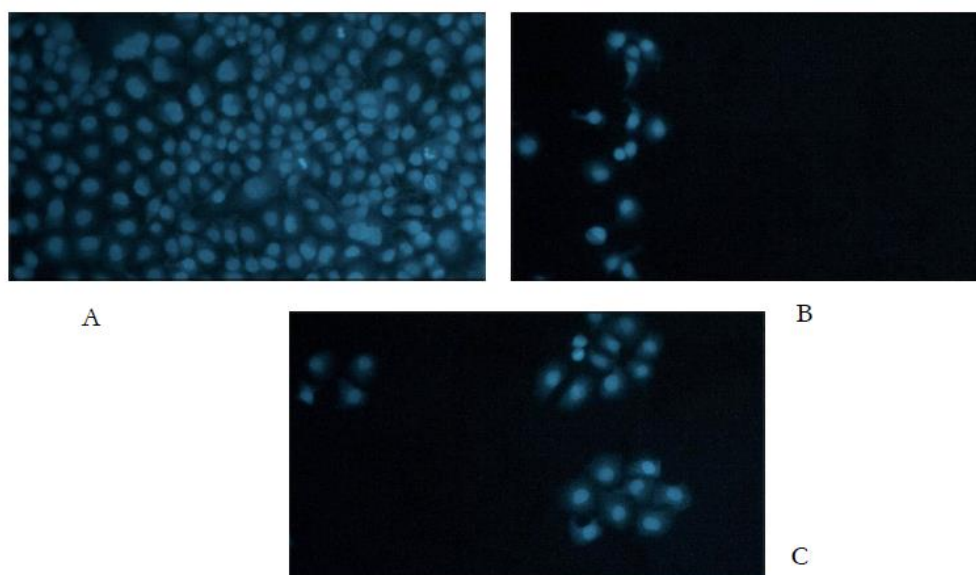


Figura 16: Células HeLa marcadas com anticorpo nuclear DAPI para análise do efeito da peçonha bruta e da Bothalernina. Concentração utilizada 1µg por poço. A: Controle, B: Células tratadas com peçonha bruta de *B. alternatus*; C: Células tratadas com Bothalernina.

A técnica de Imunocitoquímica também foi realizada para verificar a expressão de caspase-3 pelas células tumorais após tratamento com a Bothalernina na concentração de 1µg. A figura 17 mostra a presença de caspase-3, indicada pela cor vermelha.

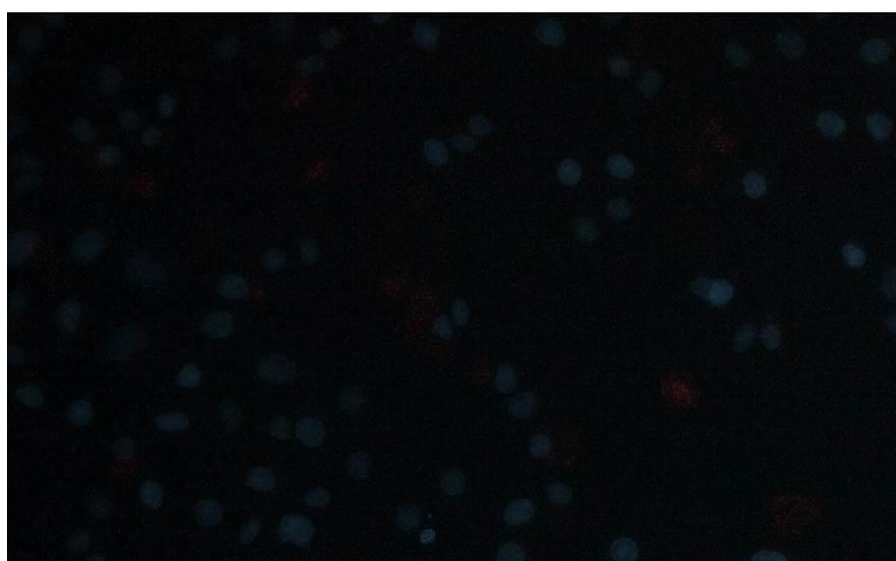


Figura 17: Imunocitoquímica com marcação para anticorpo contra caspase-3 nas células tumorais HeLa

6 DISCUSSÃO

A serpente *B. alternatus* é conhecida popularmente no Brasil como urutu, cruzeiro, cruzeira, jararaca de agosto, jararaca rabo-de-porco, coatiara, cotiara, boicoatiara e boicotiara. Esta serpente é encontrada em brejos, pântanos e outros locais úmidos, sendo comuns em plantações de cana (CAMPBELL e LAMAR, 1989). Neste trabalho, descrevemos a purificação e a caracterização da Bothalternina, uma nova toxina da serpente *B. alternatus* capaz de inibir a agregação plaquetária e o crescimento de tumor uterino.

A Bothalternina foi purificada por apenas dois passos cromatográficos: uma cromatografia de troca iônica (DEAE Sephacel), seguida por uma fase reversa (C₂/C₁₈). Quando analisada por SDS-PAGE, a toxina apresentou banda única com massa molecular aparente de 32kDa, tanto na presença como na ausência de agente redutor (fig. 10).

A Bothalternina foi submetida à sequenciação N-terminal por degradação de Edman (fig. 11). Os primeiros 33 resíduos de aminoácidos da região N-terminal foram determinados (IIISPPVCGNELLEVGEEDCGTPENCQNECCDA) e submetidos ao banco de dados BLAST. Sua sequência primária mostrou similaridade com outras metaloproteases. Curiosamente, essa sequência começa na região dos domínios desintegrina-like e rico em cisteína (DC) (resíduo 403) de outras SVMPs da classe PIII e mostrou a mesma sequência da Jararagina (PAINE, 1992), Jararagina-C (USAMI, 1994), Leucurogina (HIGUCHI, 2011), VAP2A (MASUDA, 1998).

As SVMPs da classe PIII podem sofrer proteólise/autólise durante sua secreção (FOX E SERRANO, 2005) ou sob condições não fisiológicas *in vitro*, tais como o pH alcalino, ou baixo teor de cálcio, na presença de agentes redutores (FOX E SERRANO, 2008). Essas proteases, quando clivadas, podem gerar polipeptídeos biologicamente ativos intactos de cerca de aproximadamente 30kDa, que correspondem ao domínio DC (ASSAKURA, 2003). Contudo, nenhum domínio protease liberado a partir do domínio DC foi isolado intacto da peçonha, uma vez que eles são aparentemente instáveis, quando sozinhos (SHIMOKAWA, 1997; MOURA- DA-SILVA, 2003; FOX E SERRANO, 2005, 2008). Bothropasina (MANDELBAUM, 1982), Brevilysina-H6 (TERADA, 1991), Leucurolisina-B (SANCHEZ, 2007) e Jararagina (PAINE, 1992) são SVMPs de classe PIII composta de um domínio metaloprotease associado a um domínio de DC, que pode ser liberada a partir de eventos auto proteolíticos.

Bothalternina é semelhante à jararagina C (28kDa) (USAMI, 1994), toxina que contém o domínio DC liberado por meio de uma auto proteólise da jararagina de *B. jararaca* (PAINE, 1992), uma SVMP de classe PIII. Como a jararagina C, a Bothalternina não induziu

hemorragia ou atividade coagulante e anticoagulante. Esses resultados corroboram com a sequência N-terminal e sugerem que Bothalernina possa ser um fragmento de SVMP da classe PIII, como proposto por Fox e Serrano (2008), no qual o domínio de DC foi processado a partir do domínio de protease.

As metaloproteases/desintegrina isoladas de peçonha de serpentes são compostos farmacologicamente ativos que interferem no sistema hemostático, devido à sua alta complexidade estrutural e funcional com múltiplos domínios que sinalizam seus efeitos biológicos. Essas proteases são componentes que interferem na agregação plaquetária por se ligarem às integrinas presentes na membrana das plaquetas.

As integrinas são uma ampla família de glicoproteínas que constituem grupos de receptores da superfície celular, os quais possuem duas subunidades, designadas alfa (120-170 kDa) e beta (90-100 kDa), associadas de maneira não covalente. Elas proporcionam a adesão entre as células e destas com as proteínas da matriz extracelular da membrana basal.

As integrinas têm papel importante em diversas etapas celulares, como o crescimento, desenvolvimento, morfologia e a indução de eventos sinalizadores essenciais para a sobrevivência, proliferação e diferenciação celular, bem como no desenvolvimento de tumores. Uma característica importante destas moléculas é que elas existem em estados inativos ou ativos, de acordo com o estímulo celular. Uma célula ativada pode transmitir um sinal a partir de seu citoplasma e, assim, modificar a conformação dos domínios extracelulares das integrinas da membrana celular, aumentando sua afinidade pelos ligantes (sinalização “inside out”). Da mesma forma, a união de uma integrina com seu ligante pode afetar processos intracelulares, incluindo proliferação e apoptose (sinalização “outside in”).

No presente trabalho, a Bothalernina foi testada quanto ao seu efeito sobre a agregação plaquetária. Curiosamente, os nossos resultados mostraram que a Bothalernina foi capaz de inibir 58% da agregação plaquetária induzida pela ristocetina (fig. 12A) e 30% quando induzida pelo ADP (fig 12B). Por outro lado, a Bothalernina não inibiu a agregação induzida pela epinefrina (fig. 12C).

Provavelmente a Bothalernina possui um domínio desintegrina-like, encontrado em algumas SVMPs. Este domínio liga-se às integrinas e, assim, inibe a agregação plaquetária. No entanto, mais estudos são necessários para elucidar o mecanismo de como a Bothalernina inibe a agregação plaquetária. De acordo com KAMIGUTI (1996), a ristocetina é um antibiótico que induz a ligação de FvW a GPIb/V/IX *in vitro*. Estes mesmos autores sugerem que a Jararagina inibe a agregação induzida pela ristocetina por hidrolisar o FvW em sua região N-terminal, que contém o sítio de ligação para o receptor GPIb. Como a Bothalernina

não possui efeito catalítico, sugerimos que a inibição da agregação de plaquetas induzida por ristocetina e ADP ocorra por meio da ligação da toxina ao receptor de GPIb.

Outra SVMP classe P-III, como por exemplo, a Acuragina, purificada da peçonha de *Agkistrodon acutus*, também inibe a agregação plaquetária induzida por colágeno e ristocetina por degradar o colágeno e o FvW, respectivamente (WANG e HUANG, 2002). Com relação ao efeito sobre a GPIb, algumas SVMPs, Kistomin e Mocarhagin, demonstram degradar esse receptor plaquetário (HUANG, 1993; WARD, 1996). Por sua vez, Crotalin, uma SVMP classe P-I, degrada não apenas o FvW, mas também seu receptor plaquetário GPIb, resultando em inibição da agregação plaquetária induzida por ristocetina (WU, 2001).

Dentre os inibidores da agregação plaquetária isolados de peçonha de serpentes, as desintegrinas são descritas como as mais potentes (MARKLAND e SWENSON, 2013). Isso ocorre devido à presença do motivo RGD em sua sequência que reconhece e se liga à integrinas da superfície plaquetária, em especial a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$, bloqueando a sua interação com o fibrinogênio. Dessa forma, as desintegrinas impedem a última etapa da agregação plaquetária e a formação de coágulos, contribuindo com os sintomas hemorrágicos do envenenamento. Algumas desintegrinas são capazes de se ligar à integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ não ativada, enquanto outras requerem ativação prévia (RAMOS e SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Como a interação das desintegrinas com a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ impede a última etapa da agregação plaquetária, desintegrinas-RGD inibem a agregação por diversos agonistas, incluindo ADP, epinefrina, ácido araquidônico e colágeno (SAVEJIC, 2011).

Inúmeras metaloproteases/desintegrinas são potentes drogas para o tratamento de doenças cardiovasculares, devido à sua simplicidade estrutural e mecanismo de interação com a integrina $\alpha\text{IIb}\beta 3$ (DU, 2006). Algumas delas já estão em avanço clínico, como exemplo temos os medicamentos Aggrastat® e Ancrod® que têm como princípio ativo as desintegrinas-RGD (Echistatin e Kistrin, respectivamente). Esses medicamentos são utilizados em pacientes com trombose e outras disfunções cardiovasculares por serem potentes agentes antiplaquetários (ADLER, 1991; MONLEON, 2005).

As metaloproteases/desintegrinas também podem apresentar atividade antitumoral por ser capaz de inibir a migração celular de tumores, a metástase e a angiogênese dependentes de integrinas (COMINETTI, 2004). Para diferenciação e crescimento, as células necessitam estarem ancoradas a um substrato. Esta ligação estimula e controla a progressão através do ciclo celular. Quando as integrinas não conseguem se ligar a uma matriz, as células evoluem para apoptose. Defeitos na interação entre moléculas de adesão possuem um papel importante no desenvolvimento do câncer e a presença ou ausência destes contribui para o

desenvolvimento das características das células neoplásicas. À medida que o tumor se desenvolve, as propriedades de adesão de suas células modificam-se e elas desligam-se da massa tumoral e adquirem a capacidade de migrar e invadir outros órgãos.

O tripeptídeo arginina – glicina - ácido aspártico (RGD) bloqueia várias integrinas através da interação com seus ligantes, inibindo o comportamento invasivo de células de melanoma *in vitro* e, reduzindo o número de depósitos metastáticos destas células *in vivo*.

Entre o grupo das integrinas, um dos membros mais importantes é o receptor $\alpha V\beta 3$ que parece ser regulado durante o desenvolvimento tumoral. O receptor integrina $\alpha V\beta 3$ também desempenha papel significativo na angiogênese tumoral, apoptose e no processo de transdução de sinais. Na angiogênese, as células do endotélio aumentam a expressão da integrina $\alpha V\beta 3$, que nesta atua como um constituinte de superfície que potencializa a invasão e proliferação celular.

A citotoxicidade da Bothalernina nas células de câncer uterino foi analisada por meio da viabilidade celular e a indução da apoptose, verificada por meio da expressão de caspase-3. A viabilidade foi estimada utilizando o método colorimétrico de MTT que indica a quantidade de células viáveis com base na atividade da enzima mitocondrial succinato-desidrogenase ativa, presente apenas nas células metabolicamente ativas com cadeia respiratória intacta.

Nossos resultados mostraram que a Bothalernina possui capacidade de inibir o crescimento das células tumorais de colo uterino *in vitro*, mesmo em doses muito pequenas. A técnica de Imunocitoquímica também foi realizada para verificar a expressão de caspase-3 pelas células tumorais após tratamento com a Bothalernina na concentração de 1 μ g e com isso, acrescentar informações aos resultados obtidos pela técnica de MTT. A caspase-3 é a principal molécula efetora da apoptose, e a sua presença (fig. 17) indica que a Bothalernina induz um processo de morte celular programado nas células HeLa. Como a toxina não apresenta efeito enzimático, sugerimos que o mecanismo de ação é atribuído, provavelmente, por uma interação à integrinas presentes na superfície dessas células. Parece que esse efeito está relacionado à especificidade da célula tumoral, uma vez que a Bothalernina não interferiu no crescimento de leucócitos (resultado não mostrado).

Diante deste contexto, as SVMs são compostos farmacologicamente ativos que interferem no sistema adesão célula-célula e célula-matriz, que apresentam vários mecanismos capazes de interferir na função plaquetária e no desenvolvimento de tumores.

Uma investigação detalhada desses componentes presentes em peçonha de serpentes pode fornecer informações para o desenvolvimento de drogas que podem ser aplicadas em terapias de várias desordens trombóticas, bem como para o tratamento do câncer.

7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, nós descrevemos um processo para a purificação da Bothalernina (32kDa), uma toxina constituída por domínios ricos em cisteína e desintegrina-like, originado a partir de autólise de SVMPs de classe PIII da peçonha de *B. alternatus*. A Bothalernina pode ser de interesse médico, pois é um inibidor antiplaquetário e antitumoral que poderá ser utilizado como ferramenta para o desenvolvimento de novos agentes terapêuticos para prevenir e tratar pacientes com distúrbios trombóticos e com câncer.

REFERÊNCIAS

- ANDREWS, R.; BERNDT, M.C. Snake venom modulators of platelet adhesion receptors and their ligands. **Toxicon**, v. 38, p.775-791, 2000.
- ADLER, M.; LAZARUS, R. A.; DENNIS, M. S.; WAGNER, G. Solution structure of kistrin, a potent platelet aggregation inhibitor and GP IIb-IIIa antagonist. **Science**, v. 253, p. 445-448, 1991.
- ASSAKURA, M.T.; SILVA, C.A.; MANTELE, R.; CAMARGO, A.C.M.; SERRANO, S.M.T. Molecular cloning and expression of structural domains of bothropasin, a P-III metalloproteinase from the venom of *Bothrops jararaca*. **Toxicon**, v. 41, p. 217-227, 2003.
- AZEVEDO-MARQUES, M. M.; CUPO, P.; HENRING, S. E. Envenomation caused by poisonous animals: Poisonous snakes. **Medicina**, v. 36, p. 480-489, 2003.
- BARRAVIERA, B. Estudo clínico dos acidentes ofídicos. **Jornal Brasileiro de Medicina**, v. 65, p. 209-250, 1993.
- BATTELLINO, C.; PIAZZA, R.; SILVA, A. M. M.; CURY, Y.; FARSKY, S. H. P. Assessment of bothropic antivenom therapy on microcirculatory effects induced by *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 41, p. 583-593, 2003.
- BÉRNILS, R. S.; COSTA, H. C. List of species. Vesion 2012.2. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. Disponível em: <<http://www.sbherpetologia.org.br/>>. Acesso em: 31 mar. 2013.
- BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic Metalloproteinases from snake venoms. **Pharmac. Ther**, v. 62, p. 325-372, 1994.
- BOCHNER, R.; STRUCHINER, C. J. Snake bite epidemiology in the last 100 years in Brazil: a review. **Cad. Saúde Pública**, v. 19, p. 7-16, 2003.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Guia de Vigilância Epidemiológica: Acidentes por Animais Peçonhentos. **Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de Vigilância Epidemiológica**. v. 816 p. 39, 2009.
- BRASIL. Ministério da Saúde. INCA - Instituto Nacional do Câncer. **Estimativas 2008**: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: MS, 2007. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/cancer>>. Acesso em: 05 dez. 2012.
- BUCARETCHI, F.; HYLOP, S.; VIEIRA, R. J.; TOLEDO, A. S.; MADUREIRA, P. R.; CAPITANI, E. M. B. Bites by coral snakes (*Micrurus* spp.) in Campinas, State of São Paulo, Southeastern Brazil. **Rev. Inst. Med. Trop**, v. 48, p.141-145, 2006.
- CALVETE, J. J.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venomomics. Strategy and applications. **J. Mass Spectrom**, v. 42, p. 1405-1414, 2007.

CALVETE, J. J.; MARCINKIEWICZ, C.; MONLEÓN, D.; ESTEVE, V.; CELDA, B.; JUÁREZ, P.; SANZ, L. Snake venom disintegrins: evolution of structure and function. **Toxicon**, v.45, p.1063-1074, 2005.

CALVETE, J. J.; MORENO-MURCIANO, M. P.; THEAKSTON, D. G.; KISIEL, D. G.; MARCINKIEWICZ, C. Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemical Journal**, v. 372, p.725-734, 2003.

CAMEY, K. U.; VELARDE, D. T.; SANCHEZ, E. F. Pharmacological characterization and neutralization of the venoms used in the production of bothropic antivenom in Brazil. **Toxicon**, v. 4, p. 501-509, 2002.

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. v. 2 p. 709–761, 2004.

CARDOSO, J. L. C.; FRANÇA, F. O. S.; FAN, H. W.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD JR, V. **Animais Peçonhentos no Brasil: Biologia, clínica e terapêutica dos acidentes**. 2ª Edição. São Paulo: Sarvier, 2003.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, p. 1279-1303, 1991.

COELHO, A.L.J. et al. Effects of Jarastatin, a novel snake venom disintegrin, on Neutrophil migration and actin cytoskeleton dynamics. **Experimental Cell Research**, v. 251, p. 379-387, 1999.

COMINETTI, M. R. **Estudo dos efeitos metaloproteases/desintegrinas isoladas do veneno da serpente *Bothrops alternatus* sobre a adesão celular e expressão gênica**. Tese (Doutorado em Ciências Fisiológicas) – Universidade Federal de São Carlos, São Carlos, 2004.

COMINETTI, M.R.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S. Alternagin-C, a disintegrin-like protein, induces vascular endothelial cell growth factor (VEGF) expression and endothelial cell proliferation in vitro. **J Biol Chem.**, v. 279, p. 18247-55, 2004.

DA SILVA, C.J.; JORGE, M.T.; RIBEIRO, L.A. Epidemiology of snakebite in a central region of Brazil. **Toxicon**, v. 41, p. 251-255, 2003.

DENMEADE S.R.; ISAACS J.T. The SERCA pump as a therapeutic target: making a "smart bomb" for prostate cancer. **Cancer Biol The.** v. 4, p.14-22, 2005.

DU, X. Y.; CLEMETSON, J. M.; NAVDAEV, A.; MAGNENAT, E. M.; WELLS, T. N.; CLEMETSON, K. J. Ophioluxin, a convulxin-like C-type lectin from *Ophiophagus Hannah* (King cobra) is a powerfull platelet activator via glycoprotein VI. **J. Biol. Chem.**, v. 277, p. 35124 – 35132, 2002.

DU, X. Y.; SIM, D. S.; LEE, W. H.; ZHANG, Y. Blood cells as targets of snake toxins. **Blood cells, Molecules & Diseases**, v. 36, p. 414-421, 2006.

EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chem. Scand.** v. 4, p. 283-293, 1950.

FELDING-HABERMANN et al. Role of alpha V integrins and vitronectin in human melanoma cell growth. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**, v. 57, p. 233-40, 1992.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, v. 72, p. 200-209, 2009.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, p. 3016-3030, 2008.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 repolysin family of metalloproteinases, **Toxicon**, v. 45, p. 969-985, 2005.

FOX, J. W.; BJARNASON, J. B. Atrolysins: metalloproteinases from *Crotalus atrox* venom. **Methods Enzymol.**, v. 248, p. 368-387, 1995.

FREY-VOGEL, T. A.; PERRET, B. A. Notes on toxicology. **Experientia**, v. 29, p. 1137-1452, 1973.

FUNASA- Fundação Nacional de Saúde. Manual de diagnóstico e tratamento por animais peçonhentos. **Ministério da Saúde**. p.120, 2001.

GAWAZ, M. Role of platelets in coronary thrombosis and reperfusion of ischemic myocardium. **Cardiovascular Research**, v. 61, p. 498-511, 2004.

GUTIÉRREZ, J. M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon**, v. 54, p. 976-987, 2009b.

GUTIÉRREZ, J.M.; ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A. Experimental pathophysiology of systemic alterations induced by *Bothrops asper* snake venom. **Toxicon** v. 54, p. 976-987, 2009.

GUTIÉRREZ, J.M., RUCAVADO, A. Snake venom metalloproteinases: their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, p.841-850, 2000.

HAHN, W. C.; WEINBERG, R. A. Modelling the molecular circuitry of cancer. **Nature Reviews Cancer** v. 2, p. 332-341, 2002.

HIGUCHI, D.A. Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon** v. 58, p. 123-129, 2011.

HICKMAN, C. P.; ROBERTS, L. S.; LARSON, A. **Princípios integrados de zoologia**. 11ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, cap. 28, p. 540-541, 2004.

HITE, L. A.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Sequence of a cDNA clone encoding the zinc metalloproteinase hemorrhagic toxin e from *Crotalus atrox*: evidence for signal, zymogen, and disintegrin-like structures. **Biochemistry**, v. 31, p. 6203-6211, 1992.

HONG, S. Y.; LEE, H.; YOU, W. K.; CHUNG, K. H.; KIM, D. S.; SONG, K. The snake venom disintegrin salmosin induces apoptosis by disassembly of focal adhesions in bovine capillary endothelial cells. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 302, p. 502-508, 2003.

HUANG, T. F.; CHANG, M. C.; TENG, C. M. Antiplatelet protease, kistomin, selectively cleaves human platelet glycoprotein Ib. **Biochim. Biophys. Acta.**, v. 1158, p. 293-299, 1993.

IBA, K.; ALBRECHTSEN, R.; GILPIN, B. J.; LOECHEL, F.; WEWER, U. M. Cysteine-rich domain of human ADAM 12 (meltrin alpha) supports tumor cell adhesion. **Am. J. Pathol.**, v. 154, p. 1489-1501, 1999.

JIA, L. G.; WANG, X. M.; SHANNON, J. D.; BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Function of disintegrin-like/cysteine-rich domains of atrolysin A. Inhibition of platelet aggregation by the recombinant protein and peptide antagonists. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 373, p. 281-286, 2000.

JURK, K.; KEHREL, B. E. Platelets: Physiology and Biochemistry. **Seminars in thrombosis and hemostasis**, v. 31, p.381-392, 2005.

KAMIGUTI, A. S. Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, p. 1041-1049, 2005.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; THEAKSTON, R. D. G.; ZUZEL, M. Insights into the mechanism of haemorrhage caused by snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 34, p. 627-642, 1996b.

KAMIGUTI, A. S.; HAY, C. R. M.; ZUZEL, M. Inhibition of collagen-induced Platelet aggregation as the result of cleavage of $\alpha 2\beta 1$ integrin by the snake venom metalloproteinase jararhagin. **Biochem. J.**, v. 320, p. 635-641, 1996a.

KANG, T. S.; KINI, R. M., *et al.* Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, v. 278, p. 4544 - 4576, 2011.

KAUSKOT, A.; COMINETTI, M. R.; RAMOS, O. H.; BECHYNE, I.; RENARD, J. M.; HOYLAERTS, M. F.; CREPIN, M.; LEGRAND, C.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; BONNEFOY, A. Hemostatic effects of recombinant DisBa-01, a disintegrin from *Bothrops alternatus*. **Front. Biosci.** v. 13, p. 6604-6616, 2008.

KINI, R. M., EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (disintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, v. 30, p. 265-293, 1992.

LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, v. 227, p. 680-689, 1970.

LAING, G. D.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Jararhagin and its multiple effects on hemostasis. **Toxicon**, v. 45, p. 987–996, 2005.

MANDELBAUM, F.R.; REICHEL, A.P.; ASSAKURA, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca* (Jararaca). **Toxicon** v. 20, p. 955-972, 1982.

MARKLAND, F.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases, **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, 2013.

MARKLAND, F. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, v. 36, p. 1749 -1800, 1998.

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1477, p. 146-156, 2000.

MAYNARD, D. M.; HEIJNEN, H. F. G.; HORNE, M. K.; WHITE, J. G.; GAHL, W. A. Proteomic analysis of platelet α -granules using mass spectrometry. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v. 5, p. 1945-1955, 2007.

MEBS, D. **Progress in the characterization of venoms and standardization of antivenoms**. WHO Offset Publication No. 58. Geneva, 1981.

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

MOURA-DA-SILVA, A. M; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, p. 2893-2905, 2007.

NIC, National Cancer Institute, 2011. **What is cancer? U.S. National Institute of Health**. Acessado em: <http://www.cancer.gov/cancertopics/whatisacancer> em 02 fev. 2011.

NISHIDA, S.; USAMI, Y., *et al.* Purification and characterization of bothrombin, a fibrinogenclotting serine protease from the venom of *Bothrops jararaca*. **Biochemistry**, v. 33, p.1843-1849, 1994.

OKUDA, D.; KOIKE, H.; MORITA, T. A new gene structure of the disintegrin family: a subunit of dimeric disintegrin has a short coding region. **Biochemistry**, v. 41, p. 14248-14254, 2002.

OLIVEIRA, F. **Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caíçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bthas) e caracterização bioquímica da BthT1**. Tese (Doutorado em Ciências Biológicas – Biologia Molecular) - Universidade de Brasília, Brasília, 2001.

OSHIKAWA, K.; TERADA, S. Ussuristatin 2, a novel KGD bearing disintegrin from *Agkistrodon ussuriensis* venom. **J. Biochem.**, v. 125, p. 31-35, 1999.

PAINE, M.J. ET AL. Purification, cloning, and molecular characterization of a high molecular weight hemorrhagic metalloprotease, jararhagin, from *Bothrops jararaca* venom. Insights into the disintegrin gene family. **J. Biol. Chem**, v. 267, p. 22869-22876, 1992.

PINHO, F. M.; YU, L.; BURDMANN, E. A. Snake bite induced acute kidney injury in Latin America. **Semin Nephrol**, v. 28, p. 354–362, 2008.

RÁDIS-BAPTISTA G. Integrins, Cancer as Snake Toxins (Mini-Review). *J. Venom. Anim. Toxins* incl. **Trop. Dis**, v. 11 p. 220, 2005.

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAÚJO, H. S. Snake venom metalloproteases - structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C**, v. 142, p. 328–346, 2006.

RANG, H. P.; DALE, M. M.; RITTER, J. M.; MOORE, P. K. **Farmacologia**. 6ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2007.

SANCHEZ, E.F. et al. Structural and functional characterization of a P-III metalloproteinase, leucurolysin-B, from *Bothrops leucurus* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics** v. 468, p. 193-204, 2007.

SCARBOROUGH, R. M.; ROSE, J. W.; HSU, M. A.; PHILLIPS, D. R.; FRIED, V. A.; CAMPBELL, A. M.; NANNIZZI, L.; CHARO, I. F. Barbourin. A GPIIb-IIIa-specific integrin antagonist from the venom of *Sistrurus M. barbouri*. **J. Biol. Chem.**, v. 266, p. 9359-9362, 1991.

SERRANO, S. M. T.; FOX, J. W. The cysteine-rich domain of snake venom metalloproteinases is a ligand for von Willebrand factor A domains: role in substrate targeting. **J. Biol. Chem**, v. 281, p. 39746-39756, 2006.

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases: sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, p. 1115-1132, 2005.

SHIMOKAWA, K.; JIA, L. G.; SHANNON, J. D.; FOX, J. W. Isolation, sequence analysis, and biological activity of atrolysin E/D, the non-RGD disintegrin domain from *Crotalus atrox* venom. **Arch. Biochem. Biophys.**, v. 354, p. 239-246, 1998.

SHIMOKAWA, K.; SHANNON, J. D.; JIA, L. G.; FOX, J. W. Sequence and biological activity of Crotocollastatin-C: a desintegrin-like/cysteine-rich two domain protein from *Crotalus atrox* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 343, p. 35-43, 1997.

SILVA, M. B. et al. A prothrombin activator from *Bothrops erythromelas* (jararaca-da-seca) snake venom: characterization and molecular cloning. **Biochemical Journal**, v. 369, p. 129-139, 2003.

SINAN - Sistema de Informações de Agravos de Notificação. **Acidente por animais peçonhentos**. Disponível em: <<http://dtr2004.saude.gov.br/sinanweb/index.php>>. Acesso em: 31 mar. 2013.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R.; FONTES, M. R. M.; SOARES, A. M. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A2 homologue: an example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, p. 371-381, 2006.

SWENSON, S.; MARKLAND JR., F. S. Snake venom fibrin(ogen)olytic enzymes. **Toxicon**, v .45, p. 1021-1039, 2005.

SWENSON, S.; RAMU, S.; MARKLAND, F. S. Anti-angiogenesis and RGD-containing snake venom disintegrins. **Curr. Pharm. Des.**, v. 13, p. 2860-2871, 2007.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; BENTO, L.; DELLA-CASA, M. S.; MARQUES-PORTO, R.; TAKEHARA, H. A.; GUTIÉRREZ, J. M.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A. M. Snake Venom Metalloproteinases: Structure/ function relationships using monoclonal antibodies. **Toxicon**, v. 42, p. 801-808, 2003.

USAMI, Y. et al. A 28kDa-protein with disintegrin-like structure (jararhagin-C) purified from *Bothrops jararaca* venom inhibits collagen- and ADP-induced platelet aggregation. **Biochemical and Biophysical research Communications** v. 201, p. 331-339, 1994.

WARREL, D.A. Snakebites in Central and South America: epidemiology, clinical features and clinical management. In: CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W. **The Venomous Reptiles of the Western Hemisphere**. Ithaca: p. 709–761, 2004.

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, p. 951-967, 2005.

WOLBERG, A. S. Thrombin generation and fibrin clot structure . **Blood reviews**, v. 21, p. 131-142, 2007.

WU, W. B.; PENG, H. C.; HUANG, T. F. Crotalin, a vWF and GP Ib cleaving metalloproteinase from venom of *Crotalus atrox*. **Thromb. Haemost.**, v. 86, p. 1501-1511, 2001.

ZAMUDIO, K. R.; GREENE, H. W. Phylogeography of the bushmaster *Lachesis muta*: Viperidae): implications for neotropical biogeography, systematics, and conservation. **Biological Journal of the Linnean Society**, v. 62, p. 421-442, 1997.

ZANG, J. et al. Purification, partial characterization and crystallization of acucetin, a protein containing both disintegrin-like and cysteine-rich domains released by auto proteolysis of a P-II-type metalloproteinase AaH-IV from *Agkistrodon acutus* venom. **Biological Crystallography**, v. 59, p. 2310-2312, 2003.

ZHU, L.; YUAN, C.; CHEN, Z.; WANG, W.; HUANG, M. Expression, purification and characterization of recombinant jerdonitin, a P-II class snake venom metalloproteinase comprising metalloproteinase and disintegrin domains. **Toxicon**, v. 55, p. 375-380, 2010.

Anexo 1: Parecer do Comitê de Ética na Utilização de Animais

Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
Comissão de Ética na Utilização de Animais (CEUA)
Avenida João Naves de Ávila, nº. 2160 - Bloco A, sala 224 - Campus Santa
Mônica - Uberlândia-MG –
CEP 38400-089 - FONE/FAX (34) 3239-4131; e-mail: ceua@propp.ufu.br;
www.comissoes.propp.ufu.br

**ANÁLISE FINAL Nº 028/13 DA COMISSÃO DE ÉTICA NA UTILIZAÇÃO DE
ANIMAIS PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEUA/UFU 108/12**

Projeto Pesquisa: “Caracterização funcional, biológica e estrutural de proteases purificadas de peçonhas de serpentes brasileiras”.

Pesquisador Responsável: Fábio de Oliveira

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com animais nos limites da redação e da metodologia apresentadas. Ao final da pesquisa deverá encaminhar para a CEUA um relatório final.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO DE PESQUISA APROVADO.

OBS: O CEUA/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEUA PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 05 de Fevereiro de 2013

Prof. Dr. César Augusto Garcia
Coordenador da CEUA/UFU

Anexo 2: Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos



Universidade Federal de Uberlândia
Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-Graduação
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP
Av. João Naves de Ávila, nº 2121 - Bloco A - sala 224 - Campus Santa Mônica - Uberlândia-MG -
CEP 38408-144 - FONE/FAX (34) 3239-4131

ANÁLISE FINAL Nº. 564/11 DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA PARA O PROTOCOLO REGISTRO CEP/UFU
055/11

Projeto Pesquisa: "Purificação e caracterização de toxinas de serpentes do gênero *Bothrops* com ação na hemostasia".

Pesquisador Responsável: Fábio de Oliveira

De acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, o CEP manifesta-se pela aprovação do protocolo de pesquisa proposto.

O protocolo não apresenta problemas de ética nas condutas de pesquisa com seres humanos, nos limites da redação e da metodologia apresentadas.

O CEP/UFU lembra que:

a- segundo a Resolução 196/96, o pesquisador deverá arquivar por 5 anos o relatório da pesquisa e os Termos de Consentimento Livre e Esclarecido, assinados pelo sujeito de pesquisa.

b- poderá, por escolha aleatória, visitar o pesquisador para conferência do relatório e documentação pertinente ao projeto.

c- a aprovação do protocolo de pesquisa pelo CEP/UFU dá-se em decorrência do atendimento a Resolução 196/96/CNS, não implicando na qualidade científica do mesmo.

SITUAÇÃO: PROTOCOLO APROVADO

Entrega de Relatório Parcial: **Abril de 2012.**

Entrega de Relatório Final: **Dezembro de 2012.**

OBS.: O CEP/UFU LEMBRA QUE QUALQUER MUDANÇA NO PROTOCOLO DEVE SER INFORMADA IMEDIATAMENTE AO CEP PARA FINS DE ANÁLISE E APROVAÇÃO DA MESMA.

Uberlândia, 09 de setembro de 2011.

/ Prof. Dra. Sandra Terezinha de Farias Furtado
Coordenadora do CEP/UFU