

**INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES**  
**Autarquia Associada à Universidade de São Paulo**

**ESTUDO DO VENENO DE *Crotalus vegrandis* E DE SUAS FRAÇÕES COM  
ATIVIDADE ANTITUMORAL**

**TAMARA MIECO FUCASE**

**Dissertação apresentada como parte  
dos requisitos para a obtenção do  
Grau de Mestre em Ciências na Área  
de Tecnologia Nuclear – Aplicações.**

**Orientador:  
Prof. Dr. Patrick Jack Spencer**

**SÃO PAULO**

**2011**

*Dedico este trabalho à minha família com a qual eu sempre  
pude contar em todos os momentos.  
Amo muito vocês.*

## **Agradecimentos**

*Agradeço a Deus pelo dom da vida e toda a proteção no decorrer do caminho.*

*A toda minha família, Izilda, Nelson, Sheila, Millena, Tiago e Tatiana por todo amor, carinho e paciência.*

*Ao meu orientador e querido amigo Dr. Patrick Jack Spencer pelo apoio e confiança.*

*À Dra. Ruth Vassão do Instituto Butantan pela ajuda na parte estatística, correções do trabalho e pela amizade.*

*À Dra. Maísa Splendore Della Casa do Instituto Butantan pelo fornecimento do anticorpo policlonal e pelas excelentes críticas fornecidas para o melhoramento da dissertação.*

*À Dra. Sirlei Dafre, Dra. Cláudia Angeli do Instituto de Ciências Biomédicas e ao Dr. Daniel Pimenta do Instituto Butantan pelo auxílio nas análises de espectrometria de massa.*

*Ao Dr. Daniel Perez Vieira pelas dicas fornecidas para a construção dos gráficos.*

*À Dra. Nanci do Nascimento pelo auxílio na organização do trabalho e apresentação de seminários.*

*Ao Johnny pela ajuda nas purificações e fornecimento de reagentes.*

*À Dra. Lygia Ely Morganti Ferreira Dias e Dra. Olga Zazuco Higa e Dra. Regina Affonso pelo fornecimento de reagentes e por disponibilizar os laboratórios e equipamentos.*

*Às amigas de laboratório Natália, Laura, Daniela e Rosa pelo apoio e momentos de risadas.*

*Ao Dr. Ivan Kaiser e Venom Supplies pelo fornecimento do veneno.  
Aos funcionários do IPEN, Seu Longino, Bete, Arlete e Ruth pela  
manutenção e organização dos laboratórios.*

*Aos alunos de iniciação científica Daniele Gordillo e Ed Carlos por toda a  
ajuda.*

*Ao meu amigo e colega de trabalho Vincent Louis Viala pelos conselhos  
e apoio em todos os experimentos.*

*À minha amiga e também colega de bancada Karina Corleto de Oliveira  
por toda ajuda nas purificações e momentos de descontração.*

*Ao meu grande amigo e irmão Rodrigo Guimarães Queiroz pelas risadas  
e ajuda na cultura celular.*

*À minha grande amiga Ana Elena B. da Costa por estar sempre ao meu  
lado em todos os momentos.*

*Ao IPEN pelo fornecimento de toda a estrutura necessária.*

*À FAPESP pelo financiamento do projeto*

*"Jamais considere seus estudos como uma obrigação, mas como uma oportunidade invejável para aprender a conhecer a influência libertadora da beleza do reino do espírito, para o seu próprio prazer pessoal e para o proveito da comunidade à qual seu futuro trabalho pertencer".*

**Albert Einstein**

## ESTUDO DO VENENO DE *Crotalus vegrandis* E DE SUAS FRAÇÕES COM ATIVIDADE ANTITUMORAL

Tamara Mieco Fucase

### RESUMO

Os venenos de serpentes são complexas misturas com proteínas e peptídeos que apresentam uma variedade de atividades biológicas. Devido à riqueza de seus componentes, várias moléculas encontradas no veneno vêm sendo utilizadas com fins terapêuticos, como agentes anticoagulantes ou analgésicos. Recentemente, diversos estudos têm mostrado que substâncias oriundas do veneno de serpentes são eficazes agentes antitumorais tanto *in vivo* quanto *in vitro*. Os estudos referentes ao veneno de *C. vegrandis* são escassos, o que o torna um interessante objeto de investigação para o isolamento de possíveis biomoléculas com potencial antitumorigênico. No presente trabalho analisamos este veneno com o intuito de isolar novas toxinas com atividade antitumoral. Observamos atividade em várias frações que apresentaram imunoreatividade frente a um anticorpo anti-jararagina, sugerindo a presença de metaloproteinases que, sabidamente, apresentam atividade contra certos tipos de tumores. Pela análise de seqüenciamento “de novo” foram identificadas sequências peptídicas idênticas as encontradas na espécie *C. durissus durissus*. Foi identificada também uma fração ativa de baixo peso molecular que acreditamos ser um análogo à crotoxina que já foi relatada neste veneno.

## STUDY OF VENOM *Crotalus vegrandis* AND THEIR FRACTIONS WITH ANTITUMOR ACTIVITY

Tamara Miecó Fucase

### ABSTRACT

Snake venoms are complex mixtures with proteins and peptides that have a variety of biological activities. Due to the high diversity of its components, several molecules found in the venom have been used for therapeutic purposes, such as anticoagulants or analgesics. Recently, several studies have shown that substances derived from snake venom are effective antitumor agents both *in vivo* and *in vitro*. The studies on the venom of *C. vegrandis* are scarce, turning it into an interesting object of investigation for the isolation of new biomolecules with potential antitumour potential. In this paper we analyzed this venom in order to isolate new toxins with antitumor activity. Cytotoxicity was detected in various fractions, and the most active showed immunoreactivity against an anti-jararrhagin, suggesting the presence of metalloproteases. Some toxins from this class have already been shown to be active against certain types of tumors. We also identified a low molecular weight active fraction of believed to be analogous to a crotoxin has already been in this venom.

## SUMÁRIO

|          |  |    |
|----------|--|----|
| <b>1</b> | <b>INTRODUÇÃO</b> .....                              | 12 |
| 1.1      | Câncer.....  | 12 |
| 1.2      | Integrinas e Câncer .....                            | 14 |
| 1.3      | Câncer de pele .....                                 | 15 |
| 1.4      | Venenos de serpentes .....                           | 17 |
| 1.5      | Venenos de serpentes e Câncer .....                  | 22 |
| 1.6      | Veneno de <i>Crotalus vegrandis</i> .....            | 25 |
| <b>2</b> | <b>OBJETIVOS</b> .....                               | 27 |
| <b>3</b> | <b>MATERIAL E MÉTODOS</b> .....                      | 28 |
| 3.1      | Material .....                                       | 28 |
| 3.2      | Fracionamento do veneno.....                         | 28 |
| 3.2.1    | Cromatografia de troca iônica .....                  | 28 |
| 3.2.2    | Diálise das frações .....                            | 28 |
| 3.2.3    | Cromatografia de exclusão molecular .....            | 28 |
| 3.2.4    | Cromatografia de afinidade .....                     | 29 |
| 3.3      | Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE ..... | 29 |
| 3.4      | Digestão e extração das proteínas do gel.....        | 29 |
| 3.5      | Sequenciamento de peptídeos por LC-MS/MS.....        | 30 |
| 3.6      | Zimografia .....                                     | 30 |
| 3.7      | Dosagem de proteínas .....                           | 31 |
| 3.8      | Cultura celular .....                                | 31 |
| 3.8.1    | Linhagens B16F10 e L929 .....                        | 31 |
| 3.8.1    | Congelamento .....                                   | 32 |
| 3.8.2    | Descongelamento .....                                | 32 |
| 3.8.3    | Plaqueamento .....                                   | 32 |
| 3.8.4    | Tripsinização e repique .....                        | 32 |
| 3.9      | Citotoxicidade e atividade proliferativa .....       | 32 |
| 3.10     | Identificação de proteínas símiles .....             | 33 |
| 3.10.1   | Dot Blot .....                                       | 33 |
| 3.10.2   | Western Blot.....                                    | 34 |

|          |   |           |
|----------|---|-----------|
| 3.11     | Análise estatística .....   | 34        |
| <b>4</b> | <b>RESULTADOS</b> .....   | <b>35</b> |
| 4.1      | Primeira etapa de purificação do veneno de <i>C. vegrandis</i> e<br>ensaio de atividade proliferativa ..... | 35        |
| 4.1.1    | Cromatografia de troca iônica e gel SDS PAGE 15% .....  | 35        |
| 4.1.2    | Ensaio de viabilidade celular MTS .....   | 37        |
| 4.2      | Segunda etapa de purificação do veneno de <i>C. vegrandis</i> e<br>ensaio de atividade proliferativa .....  | 39        |
| 4.2.1    | Cromatografia de exclusão molecular .....   | 39        |
| 4.2.2    | Ensaio de viabilidade celular das frações coletadas na coluna<br>de exclusão molecular .....                | 43        |
| 4.3      | Quantificação protéica.....   | 46        |
| 4.4      | Western Blot das proteínas fracionadas por exclusão molecular.....  | 47        |
| 4.5      | Sequenciamento de peptídeos por LC/MS/MS .....  | 48        |
| 4.6      | Cromatografia de afinidade .....  | 50        |
| 4.6.1    | Western Blot das proteínas fracionadas por afinidade .....  | 52        |
| 4.6.2    | Atividade proteolítica por zimografia .....   | 53        |
| 4.7      | Perfil comparativo dos venenos de <i>Crotalus vegrandis</i> e<br><i>Crotalus durissus terrificus</i> .....  | 53        |
| <b>5</b> | <b>DISCUSSÃO</b> .....  | <b>57</b> |
| <b>6</b> | <b>CONCLUSÃO</b> .....  | <b>66</b> |
| <b>7</b> | <b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....   | <b>67</b> |

## LISTA DE FIGURAS

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 1 -  | Fracionamento do veneno total da <i>C. vegrandis</i> em coluna aniônica .....  | 35 |
| Figura 2 -  | Gel SDS PAGE 15 % das frações I-VI coletados na troca iônica .....   | 36 |
| Figura 3 -  | Gel SDS PAGE 15 % das frações VII-XII coletados na troca iônica.....   | 37 |
| Figura 4 -  | Viabilidade celular dos picos I-XII coletados na coluna Mono Q com amostras do gradiente de Tris .....   | 38 |
| Figura 5 -  | Viabilidade celular dos picos I-XII coletados na coluna Mono Q com amostras descongeladas.....   | 39 |
| Figura 6 -  | Gel filtração do pico VI obtido na troca iônica .....  | 40 |
| Figura 7 -  | Gel filtração do pico VII obtido na troca iônica .....   | 41 |
| Figura 8 -  | Gel filtração do pico VIII obtido na troca iônica .....  | 41 |
| Figura 9 -  | Gel SDS PAGE 15% com os picos fracionados em coluna de Gel .....   | 42 |
| Figura 10 - | Gel SDS PAGE 15% com os picos fracionados em coluna de gel filtração, com a amostra de crotoxina recém-fracionada. ....                              | 43 |
| Figura 11 - | Viabilidade celular das células B16F10 expostas por 24 horas aos picos coletados após cromatografia em coluna Superdex 75 10/300.....                | 44 |
| Figura 12 - | Viabilidade celular das células B16F10 expostas por 24 horas aos picos coletados após cromatografia em coluna Superdex 75 10/300 com 200 µg/mL ..... | 45 |
| Figura 13 - | Fotomicrografias das linhagens B16F10 e L929 .....   | 46 |
| Figura 14 - | Concentrações proteicas das etapas de purificação.....   | 47 |

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Figura 15 - | Western Blot dos picos citotóxicos da gel filtração incubados com anticorpo policlonal anti-jararagina.....      | 47 |
| Figura 16 - | Western Blot dos picos citotóxicos ga gel filtração incubados com anticorpo policlonal anti-crotálico.....       | 48 |
| Figura 17-  | Perfil cromatográfico dos peptídeos obtidos da digestão da banda citotóxica de 50kDa.....                        | 48 |
| Figura 18 - | Sequências de peptídeos no formato FASTA da proteína de 50 kDa extraída do gel SDS PAGE.....                     | 48 |
| Figura 19-  | Histograma produzido pelo MASCOT de alinhamento dos peptídeos obtidos pelo LC/MS/MS .....                        | 49 |
| Figura 20 - | Resultado obtido pelo MASCOT .....   | 50 |
| Figura 21 - | Sequência de peptídeos indicando as posições e domínios .....  | 50 |
| Figura 22 - | Fracionamento em coluna Histrap HP .....   | 50 |
| Figura 23 - | Gel SDS Page 15% com amostras coletadas no fracionamento em coluna de afinidade .....                            | 52 |
| Figura 24 - | Western Blot dos picos fracionados na coluna de afinidade .....  | 52 |
| Figura 25-  | Zimografia das amostras coletadas no fracionamento em coluna de afinidade .....                                  | 53 |
| Figura 26-  | Fracionamento do veneno total em coluna aniônica do veneno de <i>C.vegrandis</i> e <i>C.d.terrificus</i> .....   | 54 |
| Figura 27-  | Dot Blot .....   | 55 |
| Figura 28-  | Western blot das frações I-VI coletadas em coluna de troca iônica (Mono Q), com anticorpo anti-crotálico.....    | 55 |
| Figura 29-  | Western blot das frações VII-XII coletadas em coluna de troca iônica (Mono Q), com anticorpo anti-crotálico..... | 55 |

## 1. INTRODUÇÃO

### 1.1 Câncer

O câncer é uma doença que atualmente atinge milhões de pessoas no mundo inteiro (Thompson *et.al*, 2008), causando muitas mortes quando descoberto tardiamente. No país, as estimativas, para o ano de 2010, serão válidas também para o ano de 2011, e apontam para a ocorrência de 489.270 novos casos. Os tipos mais incidentes, com exceção ao de pele tipo não melanoma, serão os cânceres de próstata e de pulmão no sexo masculino e os cânceres de mama e do colo do útero no sexo feminino, acompanhando o mesmo perfil da magnitude observada para a América Latina (INCA, 2011).

O termo câncer ou neoplasia maligna difere de neoplasia benigna por apresentar o poder de invasão e a capacidade de metastatizar (Rang *et.al*, 2004). Os tumores benignos são essencialmente bem delimitados, homogêneos, crescem geralmente de forma esférica e não invadem os tecidos ao seu redor, por sua vez, os tumores malignos apresentam elevada capacidade de invasão de tecidos vizinhos. Esse processo denominado metástase pode avançar até atingir o sistema circulatório, permitindo que as células malignas ganhem vias de disseminação, como os vasos sanguíneos, atingindo áreas distantes do local inicial, originando novas colônias de células tumorais. Nos estágios iniciais do desenvolvimento, quando geralmente o tumor tem poucos milímetros, a nutrição da massa tumoral é realizada basicamente por meio de difusão a partir dos tecidos vizinhos. Posteriormente, os tumores passam a depender de vasos sanguíneos próprios para que não entrem em degeneração e necrose (Brasileiro Filho *et.al*. 2000).

Os tumores se originam a partir de mutações que levam a uma perda do controle da duplicação celular. Essas mutações podem ser causadas por vários fatores, como agentes químicos, físicos, hereditários, ambientais entre outros e, podem ocorrer de diversas maneiras, como deleções ou adições de pares de base, translocações no nível cromossômico, formação de

heterodímeros, oxidação gerada por radicais livres, ativação de protooncogenes, quebra de fita dupla, entre outros. Consequentemente, proteínas param de se expressar, ou são altamente expressas. Pode haver também perda de atividade biológica, ativação de receptores silenciados, ou seja, a célula passa a ser anormal (De Vita e Rosenberg's, 2005).

Entretanto, não é toda a mutação que gera uma neoplasia, afinal, as mutações ocorrem inúmeras vezes durante toda a vida de um indivíduo, e existem mecanismos com a capacidade de corrigir as anomalias genéticas através das chamadas vias de reparo, que são acionadas todas as vezes que há algo de errado na célula. Um exemplo de via de reparo são os genes supressores de tumor e enzimas reparadoras. Quando um mecanismo de reparo é acionado, a célula pode seguir dois caminhos, o primeiro é de fato o reparo do DNA, onde a mutação é corrigida e a célula pode continuar replicando e se dividindo, já o segundo caminho é chamado de apoptose, que significa morte celular programada, assim a célula morre, levando juntamente a sua mutação. O câncer, portanto, só ocorre quando as vias de reparo acionadas são insuficientes para corrigir o dano e a apoptose não ocorre (De Vita e Rosenberg's, 2005).

A célula passa a proliferar de forma descontrolada, mais rapidamente do que as células normais do tecido à sua volta, invadindo-o e, escapando inclusive do sistema imune. As células tumorais adquirem a capacidade de se desprender do tumor e de migrar. Invadem inicialmente os tecidos vizinhos, podendo chegar ao interior de um vaso sanguíneo ou linfático e, através desses, disseminar-se, chegando a órgãos distantes do local onde o tumor se iniciou, formando as metástases. Dependendo do tipo de célula ou do tumor, alguns dão metástases mais rápidas e mais precocemente, outros o fazem bem lentamente ou até não o fazem (INCA, 2011).

Geralmente, o tecido tumoral tem a capacidade de formar novos vasos sanguíneos que os nutrirão e manterão as atividades de crescimento descontrolado; Essa neovascularização é chamada de angiogênese. Ao longo deste processo, as células tumorais interagem com diversos elementos do hospedeiro, que podem atuar facilitando a metastatização ou impedindo-a (Li *et.al.*, 2005).

A identificação de genes e moléculas que podem estar associadas à metástase e a elucidação de seu papel no processo são importantes na exploração de novos métodos para diagnósticos precoces, avaliação prognóstica e padronização de novas técnicas terapêuticas.

## 1.2 Integrinas e câncer

Os tumores apresentam alta expressão de receptores integrinas, que são glicoproteínas heterodiméricas de subunidades  $\alpha$  e  $\beta$ , ligados não-covalentemente, que interagem especificamente com proteínas da matriz extracelular, tais como o colágeno, a fibronectina e a laminina. Esta interação com a membrana basal é exigida para a integridade estrutural e funcional do tecido, modulando a proliferação, diferenciação e sobrevivência das células que o constituem (Mangini *et. al.*, 2002). Mudanças na expressão de integrinas receptoras de fibronectinas são observadas em alguns tipos de fibroblastos e alterações no padrão de expressão de algumas integrinas são apresentadas em diversas células tumorais (Plantefaber e Hynes, 1989). Os processos de migração, proliferação e desenvolvimento tumoral são influenciados por fatores de crescimento produzidos pelos tecidos do hospedeiro, os quais podem interagir com as integrinas (Honn e Tang, 1992).

Os seres humanos apresentam cerca de 24 diferentes integrinas que surgem a partir de 18 subunidades  $\alpha$  e subunidades  $\beta$ . Algumas subunidades são altamente expressas enquanto outras são expressas de maneira tecido ou estágio-dependente (Humphries *et.al.*, 2006).

Os níveis de integrinas podem ser alterados durante o processo de desenvolvimento tumoral: nos carcinomas observa-se uma distribuição desordenada e difusa das integrinas. Geralmente, a expressão de integrinas  $\beta 6$  em células epiteliais ocorre durante o desenvolvimento embrionário, quando expressas em tecidos adultos ocorre em associação com  $\alpha v$ , agindo como receptores para fibronectina, tenascina e vitronectina. A expressão de integrina  $\alpha \beta 6$  é induzida em processos de cicatrização e em carcinomas de cólon, pulmão, cavidade oral, mama e cérvix (Janes e Watt, 2006).

Níveis reduzidos na expressão de  $\alpha 5, \alpha 3$  e  $\alpha 2$  são observados em alguns tumores, enquanto o aumento nos níveis de  $\alpha 6 \beta 4$  se manifesta em

tumores de cabeça, pescoço e pele (Misejewski,1999). As alterações quantitativas e qualitativas na expressão das integrinas são observadas em estudos *in vitro* e *in vivo*, sendo expressas ou não durante um período da progressão tumoral, enquanto outras são fosforiladas, alterando as propriedades do citoesqueleto e a ligação das integrinas aos ligantes extracelulares (Fawcett e Harris, 1992).

As integrinas podem se ligar a moléculas de superfície celular e a proteínas da matriz extracelular. A maioria das proteínas extracelulares que se ligam às integrinas o faz porque elas contêm a sequência de aminoácidos Arginina-Glicina-Ácido Aspártico (RGD). Este tripeptídeo está presente nos locais de ligação de fibronectina, laminina, colágeno e várias outras proteínas extracelulares. Diversos estudos envolvem as integrinas nas interações complexas necessárias para que as células de tumor se espalhem em tecidos adjacentes normais, e formem uma vascularização funcional para a oxigenação do tumor e o seu crescimento (Hinton *et.al.* 2008).

Diversos estudos envolvem as integrinas nas interações complexas necessárias para que as células de tumor se espalhem em tecidos adjacentes normais, e formem uma vascularização funcional para a oxigenação do tumor e o seu crescimento (Goel e Languini, 2004; Akalu *et.al.*, 2005; Hinton *et.al.*, 2008), geralmente o fenótipo da célula transformada pode conter alterações nos seus receptores, por exemplo, altos níveis de  $\alpha\beta 3$  estão relacionados ao aumento da malignidade em melanomas (Chan *et.al.*, 1991).

A superexpressão de  $\alpha v$  em tumores, e sua importância no crescimento e progressão tumoral o torna um alvo importante nas terapias contra o câncer (Chen, *et.al.*, 2007).

### **1.3 Câncer de pele**

O câncer de pele não melanoma é o tipo de câncer de maior incidência para ambos os sexos. Sua letalidade é considerada baixa, porém quando há demora no diagnóstico, pode levar a ulcerações e deformidades físicas graves. O melanoma de pele é menos frequente que os outros tumores de pele, mas sua letalidade é mais elevada. Observa-se um expressivo crescimento na incidência desse tumor principalmente, em populações de cor de pele branca (INCA, 2011).

No Brasil, um estudo baseado em relatórios anatomopatológicos revelou que o melanoma maligno corresponde a 0,15% de todas as neoplasias malignas (Lapa, *et.al.*, 2002). Inúmeras são as causas que podem ser apontadas para esse aumento como as mudanças dos hábitos de vida com a exposição solar excessiva, alterações na camada de ozônio e envelhecimento da população (Rhodes, 1995 e Rosemberg *et.al.*, 1997).

Os fatores fenotípicos responsáveis pela susceptibilidade ao melanoma que podem ser destacados são: tipo de pele, cor dos olhos e cabelos, presença de sardas e nevus, histórico pessoal ou familiar de câncer cutâneo (Armmings *et.al.*, 1997).

A radiação ultravioleta (RUV) é um carcinógeno completo que inicia o processo de malignização por meio de mutações no DNA e promove o desenvolvimento do câncer por processo inflamatório inerente à exposição UV cumulativa (Bergfeld, 1997). Ela favorece o desenvolvimento de ambas as formas de câncer da pele: melanoma e não melanoma. O não melanoma está associado à ação solar cumulativa, e o melanoma, a episódios intensos de exposição solar aguda, que resulta em queimadura solar (Armmings *et.al.*, 1997).

De acordo com os sintomas apresentados pelo paciente e análises histopatológicas do tumor, cinco estágios da progressão do melanoma são propostos: nevus congênito ou comumente adquirido, com características morfológicas normais de melanócitos, nevus displásico com morfologia atípica ou alterada, fase de crescimento radial primitivo em melanoma primário (RGP), fase de crescimento vertical avançado em melanoma primário (VGP), com potencial metastático e melanoma metastático (Meier *et.al.*, 1998 e Baldi *et.al.*, 2003).

O controle de proliferação exercida pelos queratinócitos sobre os melanócitos ocorre via sinalização parácrina com fatores de crescimento, sinalização intracelular através de transdução de sinal e segundos mensageiros, e sinalização intercelular com moléculas de adesão célula-célula, célula-matriz e junções tipo gap. Os melanomas suprimem a alta expressão de E-caderinas e passam a expressar em sua superfície proteínas que irão promover a adesão das células de melanoma entre elas e entre fibroblastos e células endoteliais do estroma do tumor (Haass *et.al.*, 2005).

A interação com vários componentes da matriz extracelular e a alteração da composição dos receptores de matriz extracelular influencia nas propriedades invasivas do melanoma (Johnson, 1999). As integrinas  $\alpha\beta3$  e  $\alpha5\beta1$  são muito expressas em melanoma metastático e no melanoma tardio. A integrina  $\alpha\beta3$  está associada com a progressão do melanoma, agindo com um receptor para vitronectina, o qual auto-regula expressão na matriz de metaloproteinase-2 e favorecendo o processo invasivo da doença (Mangini, *et.al.*, 2002). Assim, os fatores presentes no microambiente tumoral, como as sinalizações célula-célula e célula-matriz são dados importantes para o desenvolvimento do melanoma metastático (Meier *et.al.*, 1998).

#### **1.4 Venenos de serpentes**

Os venenos animais são fontes riquíssimas de biomoléculas com um vasto leque de atividades sobre os mais diversos sistemas fisiológicos. Dentre estes, os venenos de serpentes são os fluidos secretórios mais concentrados que se conhece (Stocker, 1991), e causam uma variedade de efeitos biológicos, pois constituem uma mistura complexa de substâncias orgânicas e inorgânicas. Dentre os compostos inorgânicos estão os íons cálcio, zinco, manganês, ferro, potássio, entre outros. Além disso, são encontrados também componentes orgânicos, como carboidratos, lipídios, aminas biogênicas, aminoácidos e nucleotídeos (Bjarnason e Fox, 1994). Entretanto, cerca de 90% a 95% do peso seco do veneno é constituído de proteínas e peptídeos que são biologicamente ativos (Markland, 1998). Contudo, suas características bioquímicas mudam de acordo com a espécie de serpente estudada, sendo que a especialização na composição do veneno pode ocorrer independentemente da variação morfológica. Para conseguir capturar a presa e/ou digeri-la, os venenos podem apresentar os seguintes efeitos: neurotóxicos (pré / pós-sináptico), cardiotoxicos, miotóxico, coagulante (anticoagulante), hemostático (ativação / inibição) e hemorrágico (Chippaux *et.al.*, 1991).

Há aproximadamente 2.700 espécies de serpentes, onde apenas um quinto delas são venenosas (Nawarak *et.al.*, 2004), sendo distribuídas em quatro famílias: Viperidae; Atractaspidae; Elapidae e Colubridae. As Viperidae são compostas de três subfamílias: Azemiopinae, Viperinae e Crotalinae.

Conforme o maior efeito tóxico sintomático na presa, os venenos de serpente são classificados em neurotóxico e hemorrágico. As principais representantes do primeiro grupo são as Elapidae (mambas, cobras e particularmente as serpentes australianas, as mais tóxicas do mundo). Venenos de Viperidae e Crotalidae (víboras e cascavéis) apresentam números distintos de proteínas que interferem na cascata de coagulação, no sistema hemostático normal e na reparação tecidual. Manifestações de envenenamento incluem efeitos locais, sistêmicos ou ambos. Os efeitos locais imediatos incluem dor, edema e hemorragia local. Alguns sintomas são seguidos de necrose na área ao redor da picada. Os efeitos sistêmicos incluem alteração na coagulação sanguínea e vários outros tipos de alterações hemostáticas incluindo hemorragia gengival, nasal (epistaxe), uterina e expectoração sanguínea (Kamiguti *et.al.*, 1996). Consequentemente, o envenenamento por estas serpentes resultam em sangramentos persistentes. A ação sinérgica das proteínas presentes no veneno pode aumentar a sua atividade ou contribuir para o espalhamento das toxinas (Calvete *et.al.*, 2005).

As toxinas de serpentes apresentam componentes ativos com elevado potencial terapêuticos (Bennacef-Heffar e Laraba, 2003). Uma boa parte dos componentes destes venenos mimetiza estrutura e funcionalmente moléculas endógenas da presa envolvidas na homeostase escapando, porém aos mecanismos de regulação que modulam estas atividades, levando assim a exarcebação de processos fisiológicos normalmente benéficos. Assim, o envenenamento pode ser considerado um distúrbio agudo dos mecanismos de regulação da homeostase, levando a um colapso das funções fisiológicas que resulta em morte da presa ou efeitos severos em acidentados.

Quando fracionado, identificamos na maioria dos venenos de serpentes substâncias como disintegrinas, enzimas que atuam na cascata de coagulação (Monteiro e Zingali, 2002), toxinas que atuam em canais iônicos, neurotoxinas, proteases (serino e metalo), fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases (LAAOs) (Santos *et.al.*, 2008). As neurotoxinas formam uma das maiores famílias de proteínas com estruturas primárias já estabelecidas. Entre as neurotoxinas mais conhecidas estão as  $\alpha$ -neurotoxinas que se ligam a receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChRs). Elas são capazes de bloquear reversivelmente a

transmissão neural pelo ligante competitivo para nAChR localizado na membrana pós-sináptica dos músculos esqueléticos e neurônios, impedindo a transmissão neuromuscular e assim levando a morte por asfixia (Tsetlin e Hucho, 2004).

As cardiotoxinas são compostas de cadeia única, altamente hidrofóbica e básica. Os principais alvos das cardiotoxinas são as células excitáveis, provocando a despolarização e contração dos músculos cardíacos, esquelético e liso, levando a perda da excitabilidade dos nervos (Forouhar *et.al.*, 2003).

As miotoxinas são chamadas de toxinas mionecróticas e são encontradas em cascavéis e víboras. Uma das miotoxinas mais conhecidas é a miotoxina-a, isolada do veneno de *Crotalus viridis viridis* (Ownby *et.al.*, 1976). Esta miotoxina apresenta 4.6 kDa, caráter básico e é desprovida de atividade enzimática, ligando-se especificamente ao retículo sarcoplasmático, causando alteração na permeabilidade celular, provocando inchaço e lesões nas fibras musculares.

As PLA<sub>2</sub> são enzimas responsáveis por catalisar a hidrólise de fosfolípidos de membrana, liberando ácido araquidônico, dando início ao processo inflamatório. As PLA<sub>2</sub> exibem uma variedade de efeitos que são caracterizados pelo aumento da permeabilidade microvascular e formação de edema (Verheij *et.al.*, 1980).

Enzimas coagulantes incluem ativadores de fatores de coagulação como o fator II (Protrombina), V e X. Enquanto os anticoagulantes incluem ativadores de Proteína C, inibidores do complexo de formação de protrombina e fibrinogenases, com diferentes especificidades para as cadeias alfa e beta do fibrinogênio. As enzimas trombina-like apresentam uma ação coagulante *in vitro* e anticoagulante *in vivo*. Toxinas de serpente (incluindo as disintegrinas com domínios RGD) podem induzir ou inibir a agregação plaquetária, causando hemorragia ou proteólise do endotélio (Marsh, 1994).

As L-AAOs são flavoenzimas que catalizam a deaminação oxidativa de L-aminoácidos em  $\alpha$ -cetoácido com a produção de amônia e peróxido de hidrogênio. As L-AAOs apresentam diversas atividades biológicas como: agregação de plaquetas, indução de hemorragia, edema, citotoxicidade e atividade anti-HIV (Du e Clemetson, 2002).

Os venenos de Viperidae e de algumas serpentes australianas são ricos em proteases que afetam fortemente os mecanismos hemostáticos (White, 2005), elas constituem um grupo heterogêneo cuja massa molecular varia entre 20 kDa a 150 kDa, dependendo da classe, estrutura e glicosilação. Muitas dessas proteínas são constituídas de cadeia única, porém algumas apresentam subunidades. Essas proteinases diferem com relação aos seus mecanismos de catálise, sendo classificadas como metaloproteinases e seriproteinases (Serrano e Maroun, 2005).

As metaloproteinases de serpentes são membros da superfamília das proteases dependentes de zinco, pertencentes ao grupo das reprotinas caracterizado por possuir um resíduo de ácido aspártico após a terceira histidina ligante de zinco (Hooper, 1994). São proteínas potencialmente tóxicas, que apresentam a capacidade de digerir a membrana basal do endotélio e matriz extracelular, elas são sintetizadas na forma de precursores inativos ou zimogênios. Esses precursores são processados na glândula de veneno, tornando-se enzimas funcionais, o peptídeo sinal de metaloproteinase apresenta 18 aminoácidos altamente conservados, que servem como sequência sinal para determinação de sua localização celular (Shimokawa *et.al.*, 1996).

As SVMPs (Snake Venom Metalloprotease) apresentam sequência conservada de aminoácidos (PKMCGVT) na região C-terminal do pró-domínio (Grams *et.al.*, 1993).

Segundo Bjarnason e Fox (1995) as metaloproteinases foram classificadas como PI a PIV, de acordo com a sua massa molecular e domínios. As de classe PI, apresentam somente o domínio metaloproteinase com aproximadamente 24 kDa, as PII são compostas por um domínio catalítico e um domínio disintegrina que é liberado durante a atividade proteolítica (Yamada *et.al.*, 1999). Algumas disintegrinas RGD (Arg-Gly-Asp) apresentam a capacidade de inibir a adesão celular nas células tumorais, diminuindo o processo de metástase (Danen *et.al.*, 1998).

As SVMPs classificadas como PIII, são moléculas grandes com aproximadamente 50 kDa, com elevada ação hemorrágica, proteolítica e inibidora de agregação plaquetária. Além do domínio disintegrina, apresentam o domínio rico em cisteína ligado ao C-terminal da disintegrina. A proteína VAP-1 (Proteína

indutora de apoptose vascular), encontrada na serpente *Crotalus atrox*, é uma metaloproteinase do tipo PIII que induz a apoptose vascular, inibindo o crescimento de novos vasos sanguíneos (Araki *et.al.*, 2002). A classe PIV, apresenta um domínio lectina-símile, ligado por pontes dissulfeto além dos domínios que compõem a PIII (Bjarnason e Fox, 1994). Porém, uma nova classificação foi proposta a partir das modificações pós traducionais que ocorrem nas proteínas, onde são apresentadas dez classes de metaloproteinases (P-Ia, P-IIa, P-IIb, P-IIc, P-IId, P-IIe, P-IIIa, P-IIIb, P-IIIc, P-IIId), sendo as do tipo PIV, incluídas nas P-IIId (Fox e Serrano, 2008).

Entretanto, metaloproteinases fibrinolíticas não hemorrágicas foram descritas em alguns venenos (Terada *et.al.*, 1999). Estas enzimas apresentam atividade fibrinogenolítica e fibrinolítica direta, não envolvendo ativação de plasminogênio. Estas clivam a cadeia  $\alpha$  da fibrina e do fibrinogênio e mais lentamente a cadeia  $\beta$  (Siigur *et.al.*, 1998).

As disintegrinas presentes no veneno da família das Viperidae são em sua maioria antagonistas de integrinas, podendo se apresentar na forma livre ou raramente ligadas ao domínio metaloproteinase. O termo disintegrina foi usado pela primeira vez em 1990 para descrever um grupo de derivados de veneno de víbora, sendo proteínas não enzimáticas de baixo peso molecular. Essas biomoléculas são divididas em cinco diferentes subgrupos de acordo com sua cadeia polipeptídica e o número de pontes dissulfeto. As disintegrinas ofídicas são classificadas como: pequenas, médias e longas, constituídas de monômeros ou dímeros (Kim *et.al.*, 2005). As curtas são constituídas de 49 a 51 aminoácidos e 8 cisteínas, e incluem a echistatina e a eritostatina entre outras. As disintegrinas médias apresentam aproximadamente 70 aminoácidos e 12 cisteínas, como por exemplo, as proteínas kistrina, flavoridina e barbourina e as longas são geralmente compostas de 84 aminoácidos, com 14 cisteínas como a bitistatina, sendo encontradas em um grande número de espécies (Olfa *et.al.*, 2005).

A descoberta de que pequenas disintegrinas são derivadas de proteínas muito maiores que apresentam atividade catalítica, (tanto vegetal e animal) que contêm domínios disintegrina-símile, tem levado a muitas pesquisas relacionadas a ambas as proteínas (McLane *et.al.*, 1998). Inicialmente, as disintegrinas foram usadas na inibição de agregação plaquetária, mas

recentemente trabalhos vêm mostrando o seu uso como inibidor do crescimento de células tumorais, adesão, migração, invasão e/ou angiogênese.

A configuração de sua estrutura primária é basicamente composta de cisteínas conservadas, formada pelo processamento proteolítico de precursores pIII-b. Todos os resíduos de cisteína estão na forma de meias cistinas (Fujii *et.al.*, 2003).

### **1.5 Venenos de serpente e câncer**

Várias moléculas de venenos ofídicos são usadas para fins terapêuticos como o anti-hipertensivo Captopril, derivado da peçonha de *Bothrops jararaca* (Cushman *et.al.*, 1991), o Batroxobin, composto isolado da espécie *Bothrops atrox moojeni* e o Ancrod da serpente *Agkistrodon rhodostoma*, que são utilizados como anticoagulantes em cirurgias cardíacas. Outras biomoléculas estão sendo investigadas como o Enpak, potente analgésico isolado do veneno da cascavel brasileira, cujo efeito pode ser 600 vezes maior do que ao da morfina (Cury *et.al.*, 2009).

Especial atenção tem sido dada, nos últimos anos ao desenvolvimento de novas drogas com atividade antitumoral. Dentre elas, várias substâncias de origem vegetal, como a colchicina e toxinas animais, principalmente oriundas de venenos de serpentes (Jokhio e Ansari, 2005). Vários trabalhos vêm mostrando a eficácia de toxinas ofídicas purificadas como agentes antitumorais, tanto *in vitro*, quanto *in vivo* (Lipps, 1999).

Estudos mostram que várias substâncias encontradas nos venenos de serpentes têm alguma atividade antitumoral, como componentes pertencentes à família das metaloproteinases, lectina tipo-C e disintegrinas que inibem a migração celular *in vitro* e a progressão do tumor *in vivo*, interagindo especificamente com algumas integrinas nas membranas celulares (Kamiguti *et.al.*, 1998; Markland, 1998). Devido a essa possibilidade de usar toxinas extraídas de venenos de serpentes como agentes terapêuticos, várias substâncias tem sido alvo das pesquisas de terapias alternativas na luta contra o câncer. Algumas toxinas já são bem caracterizadas e estudadas, outras ainda não. Algumas disintegrinas ofídicas foram utilizadas em protocolos experimentais

de inibição do crescimento e metastatização de células tumorais, como por exemplo, a contorstrostatina, a eristostatina e a salmosina.

A contorstrostatina é uma disintegrina homodimérica proveniente de metaloproteinase PII, induz a fosforilação em células T24 de câncer de bexiga via sinalização mediada por integrinas (Rádis-Baptista, 2005), sendo responsável também pelo bloqueio dos receptores de integrinas  $\alpha 5\beta 1$  de células de melanoma (M24met), impedindo sua metastatização (Triakha, *et.al.*, 1995).

A Adenosina difosfato (ADP) se liga ao receptor plaquetário e conseqüentemente ativa o complexo glicoproteico GP IIb/IIIa, induzindo a agregação plaquetária. A eristostatina é um potente inibidor de agregação plaquetária mediada por ADP em modelos de melanoma de murino e humano (McLane *et.al.*, 2001).

A salmosina, uma disintegrina que apresenta domínio RGD, reduziu a metastatização e colonização de metástases pulmonares de células de melanoma murino B16F10 de maneira dose-dependente (Kang *et.al.*, 2000).

A jararagina é uma metaloproteinase que possui domínio tipo disintegrina obtida do veneno de *Bothrops jararaca*, e tem sido amplamente estudada em vários modelos experimentais, como nos processos inflamatórios, dor, agregação plaquetária, entre outros. A jararagina é responsável pela intensa hemorragia local, inibição da agregação plaquetária e contribui também para a hemorragia sistêmica. Resultados *in vitro* mostraram que a jararagina reduz significativamente a tumorigênese de células de melanoma humano SKMEL – 28 pré-tratadas (Corrêa Jr. *et.al.*, 2002).

Esta toxina tem efeito dose-dependente sobre várias linhagens tumorais humanas, alterando sua morfologia, viabilidade, migração e invasão *in vitro* (Costa e Santos, 2004).

Muitas disintegrinas são constituídas de motivos RGD localizadas próximas à região C-terminal. Integrinas como a  $\alpha 5\beta 1$  ou  $\alpha v\beta 3$ , apresentam sítio de ligação para o domínio RGD de proteínas da matriz extracelular, como fibronectina, vitronectina, ou Fator von Willebrand (Ruoslahti, 1996). A principal função dessas integrinas RGD dependentes no câncer já foi abordada usando várias disintegrinas com esses domínios (Eble, *et.al.*, 2003). Entretanto, ligantes

KGD, RTS, KTS, MGD, WGD e ECD também já foram identificados (McLane, 2004 e Calvete *et.al.*, 2003). A rhodocetina, uma lectina-símile da víbora da Malásia *Calloselasma rhodostoma* inibe especificamente a integrina  $\alpha 2\beta 1$  (Eble e Tuckwell, 2003). Assim como as duas disintegrinas do veneno de *Vipera lebetina*, a lebeina-1 e 2 (Eble *et.al.*, 2003).

Markland Jr. em 1986 investigou os efeitos *in vitro* e *in vivo* da enzima trombina-símile crotalase do veneno de *Crotalus adamanteus* sobre o crescimento de células de melanoma B16 murino. Os resultados obtidos sugerem que o crescimento do tumor foi significativamente reduzido *in vivo*. O autor também relatou que 50% dos animais tratados com crotalase não desenvolveram o tumor.

A crotoxina é o principal componente tóxico da peçonha de *Crotalus durificus terrificus* (Sampaio *et.al.*, 2004), com aproximadamente 23 kDa, com uma ação predominantemente neurotóxica, e é formada por um complexo não covalente de duas subunidades: uma ácida (subunidade A), com três cadeias polipeptídicas ligadas por sete pontes dissulfeto, desprovida de atividade catalítica e a básica (subunidade B) que apresenta atividade fosfolipásica (PLA<sub>2</sub>), constituída de cadeia simples com 122 aminoácidos ligados por sete pontes dissulfeto (Aird *et.al.*, 1986).

A citotoxicidade *in vitro* da crotoxina foi destacado em diversas linhagens celulares murinas (Corin *et.al.*, 1993) e tumores humanos (Rudd *et.al.*, 1994). Estudos sugerem que este efeito citotóxico está relacionado à alta expressão de receptores de fatores de crescimento epidermal nas células tumorais. A ligação aos receptores e subsequente dissociação das subunidades desencadeia uma rápida hidrólise fosfolipídica provocada pela miotoxicidade da PLA<sub>2</sub>, a qual leva a morte celular (Ownby *et.al.*, 1999).

Os relatos acima endossam a importância da busca por novos componentes com ação antitumoral ou o aproveitamento de toxinas já identificadas com potencial poder de redução do processo de metastatização, uma vez que as terapias hoje disponíveis se beneficiariam de novas drogas com maior especificidade e eficácia.

### 1.6 Veneno de *Crotalus vegrandis*

A cascavel Uracoan (*Crotalus vegrandis*) é responsável pelos acidentes ofídicos na porção leste da Venezuela e seu veneno causa graves alterações fisiopatológicas nas vítimas (Pulido-Mendez *et.al.*, 1999). Neste país, 24% dos acidentes são causados por serpentes do gênero *Crotalus*, principalmente em ambientes rurais (Rodriguez-Acosta *et.al.*, 1995). Muitos dos venenos deste gênero apresentam atividade miotóxica que leva ao desenvolvimento de rabdomiólise (Amaral *et.al.*, 1986). A atividade miotóxica é seguida de danos no músculo esquelético e liberação de creatinofosfoquinases (CPK), desidrogenase láctica (LDH) e mioglobinas.

O veneno desta espécie é altamente neurotóxico e miotóxico (Kouyoumdjian *et.al.*, 1986), Embora ocorra a paralisia respiratória secundária relacionada às atividades neurotóxicas, a causa predominante de mortes são as hemorragias locais e sistêmicas (Rodrigues-Acosta *et.al.*, 1995). No processo ocorrem distúrbios da coagulação, caracterizados por consumo de fatores de coagulação, geração de produtos de degradação de fibrinogênio, podendo ocasionar incoagulabilidade sangüínea (Rodriguez-Acosta *et.al.*, 1998).

O veneno de *Crotalus vegrandis* é de grande interesse para investigação de biomoléculas com atividade antitumoral, uma vez que Kaiser em 1987 identificou uma proteína crotóxina símile. Além disso, a literatura a respeito é muito escassa (Scannone *et.al.*, 1978; Gubensek *et.al.*, 1978; Kaiser e Aird, 1987), talvez pela limitada distribuição geográfica desta serpente, sendo localizada somente em uma exígua região de savana no leste da Venezuela e, mais provavelmente pelo número reduzido de acidentes causados por essa serpente.

O interessante é observar que os venenos do gênero *Crotalus*, amplamente distribuído no continente americano, possuem notável atividade hemorrágica em serpentes norte americanas, ao passo que esta atividade é quase inexistente na maioria das espécies sul-americanas. Desta forma, a *C. vegrandis* parece representar um elo evolutivo entre as serpentes de ambos os continentes (Rodrigues-Acosta *et.al.*, 1998).

Ao fazer uma busca nos bancos de dados de proteínas, apenas cinco sequências foram localizadas, todas de proteínas envolvidas na atividade metabólica da serpente (NADH dehydrogenase, citocromo), não constando nenhuma sequência de toxina. Portanto, trata-se de um veneno virtualmente desconhecido com grande potencial para isolamento de novas toxinas.

## **2. OBJETIVO**

Isolar e caracterizar química, biológica e imunologicamente componentes do veneno de *Crotalus vegrandis* com potencial antitumoral contra células de melanoma murino B16F10.

### **3. MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Material**

O veneno utilizado neste trabalho faz parte do estoque de venenos do Centro de Biotecnologia e foi doado pelo Dr. Ivan Kaiser (Universidade de Wyoming).

#### **3.2 Fracionamento do veneno**

##### **3.2.1 Cromatografia de troca iônica**

O fracionamento do veneno foi realizado conforme a metodologia padronizada no laboratório onde foram utilizadas 15 mg de veneno total dissolvido em 1,2 mL de tampão Tris-HCl 50mM, pH 8,0 e submetido à cromatografia de troca aniônica em coluna Mono Q 5/50 GL (Pharmacia), acoplada a um sistema de HPLC (High-Performance Liquid Chromatography), previamente ambientada no mesmo tampão. A eluição das proteínas foi realizada em fluxo de 0,8 mL/min, em gradiente de 50% de NaCl 1M pH 8,0. A absorvância do eluato foi medida em 220 nm e 280 nm.

##### **3.2.2 Diálise das frações**

As frações de interesse foram dialisadas em membrana Amicon® Ultra Millipore de 3K posicionadas em tubos de prolipropileno de 50 mL. Para a diálise, 4 mL de cada fração foram submetidos a centrifugação à 3220g durante 1 hora a temperatura de 4°C.

##### **3.2.3 Cromatografia de exclusão molecular**

A cromatografia de exclusão molecular baseia-se na separação das moléculas a partir de seu tamanho, sendo eluídas na ausência de um gradiente. Após a diálise e concentração das amostras foi realizado o fracionamento de cada uma das frações citotóxicas do veneno e 100 µL de cada fração foram injetados em coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare), ambientada em tampão Bicarbonato de Amônio 100 mM, pH 7,8 com fluxo de 0,6 mL/min.

### **3.2.4 Cromatografia de afinidade**

Na cromatografia de afinidade são utilizadas resinas que apresentam características específicas como ligantes da proteína de interesse a ser isolada dos demais componentes do veneno bruto. No caso, foi utilizada a coluna de afinidade HisTrap HP (GE Healthcare) carregada com  $Zn^{2+}$ , com o objetivo de isolar as metaloproteínas presentes no veneno bruto. Como tampão foram usados 10 mM de Tris-HCl +150 mM de NaCl em pH 7,4 (tampão A) mantido em fluxo de 1 mL/min com gradiente de 100% de 100 mM de Imidazol pH 7,4 (Tampão B). A amostra injetada foi 15 mg de veneno total diluído em 1,2 mL de tampão A.

### **3.3 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE (Sodium Dodecil Sulphate Poliacrilamide Gel Electrophoresis)**

A pureza das frações, assim como a eficiência dos métodos de purificação foi avaliada qualitativamente por eletroforese, sob condições desnaturantes e não redutoras, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). O gel de empilhamento foi preparado em uma concentração de 4% de poliacrilamida e para o gel de separação utilizou-se 15% de poliacrilamida. Agentes catalisadores (persulfato de amônio e N,N,N,N-tetrametil etilenodiamina TEMED) foram adicionados em ambos os géis para que ocorresse a polimerização dos mesmos.

Após a purificação, 40  $\mu$ L de cada amostra foram diluídos em 10  $\mu$ L de tampão de amostra não redutor (glicerol, SDS 10%, Tris 1M, pH 6,8 e azul de bromofenol) e aquecidas durante aproximadamente 5 minutos à 70°C.

Posteriormente, 10  $\mu$ L/poço da amostra foram aplicados no gel e submetidos à eletroforese sob uma voltagem constante de 90V. As amostras foram então coradas utilizando-se o corante Coomassie Blue G-250.

### **3.4 Digestão e extração das proteínas do gel**

As bandas selecionadas foram recortadas do gel e descoradas com 100  $\mu$ L de 0,1 M de Bicarbonato de Amônio + Acetonitrila 100% (1:1) e desidratadas em centrífuga a vácuo. Posteriormente as bandas foram cortadas em pedaços pequenos de aproximadamente 2 mm e rehidratadas com 100  $\mu$ L água desionizada autoclavada por 5 minutos e o mesmo volume de acetonitrila. Os pedaços dos géis foram reduzidos com 100  $\mu$ L de ditioneína (DTT) 10 mM e 0,1 M de iodoacetamida e incubados por 30 minutos a 56 °C, após a remoção do

sobrenadante os pedaços de géis foram lavados com acetonitrila. Em seguida, foi adicionado acetonitrila com 100  $\mu\text{L}$  de 55 mM de iodoacetamida/0,1 M de Bicarbonato de Amônio e incubado por 20 minutos no escuro à temperatura ambiente, após a remoção da iodoacetamida as amostras foram lavados com 200  $\mu\text{L}$  de 0,1 M de  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  por 15 minutos, centrifugados e removidos o sobrenadante e os pedaços de gel foram secados na centrífuga a vácuo.

Para a digestão foi adicionado uma solução tampão contendo 50 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$ , 5 mM  $\text{CaCl}_2$  e 12,5 ng/ $\mu\text{L}$  de tripsina a 4°C durante 30 minutos depois adicionou-se 50  $\mu\text{L}$  do mesmo tampão sem a tripsina, as amostras foram mantidas overnight.

Após a digestão enzimática foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de 25 mM  $\text{NH}_4\text{HCO}_3$  e incubados a 37°C por 15 minutos sob agitação e repetindo a operação com 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrila, o sobrenadante foi recolhido e reservado. Em seguida, foi adicionado 50  $\mu\text{L}$  de Ácido Fórmico 5% e mantidos sob agitação por 15 min a 37°C depois 50  $\mu\text{L}$  de acetonitrila durante o mesmo período, recolhendo novamente o sobrenadante e colocando-o junto com o anterior. As amostras foram secadas na centrífuga a vácuo, sendo realizado o desalting utilizando um zip tip para análise LC-MS/MS.

### **3.5 Sequenciamento de peptídeos por LC/MS/MS**

O sequenciamento de peptídeos foi conduzido em plataforma LC-MS/MS do tipo *ion trap*, equipado com nanofonte de ionização do tipo eletrospray, acoplado a um sistema HPLC, conectado a uma coluna C18 de fase reversa de 25 mm x 75  $\mu\text{m}$  em fluxo de 2  $\mu\text{L}/\text{min}$  e gradiente 5% a 80% de acetonitrila + 0,2% ácido fórmico durante 75 minutos. A ionização por electrospray foi realizada com a voltagem da fonte de 1,8 kV a temperatura de 180°C. Todos os parâmetros foram definidos utilizando Xcalibur 2.0.

Os dados foram analisados, utilizando o algoritmo Sequest<sup>®</sup> contra um banco de dados (sequências de aminoácidos) não redundante e de metaloproteinasas, usando o programa Bioworks Browser 3.3.

### **3.6 Zimografia**

Para análise da atividade proteolítica, foi realizado o teste de zimografia ou atividade gelatinolítica, que consiste em uma eletroforese das amostras em sistema SDS PAGE, que inclui 3% de gelatina no gel de separação,

com o objetivo de evidenciar a presença de metaloproteínas nas amostras coletadas após o fracionamento do veneno total em coluna de afinidade.

Após a eletroforese, o gel foi lavado duas vezes durante 15 minutos em solução 2,5% de Triton X-100 para remoção do SDS, em seguida o gel foi incubado no tampão do substrato (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e CaCl<sub>2</sub> 5 mM), a 37°C durante 20 horas. Após este tempo o gel foi corado com solução corante Coomassie Blue G-250 (Blue Silver).

### **3.7 Dosagem de proteínas**

As concentrações protéicas das amostras utilizadas no decorrer dos experimentos foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Foram usados 100 µL de amostra referentes aos picos coletados no processo de purificação misturados em 3 mL de reagente. Nesta técnica, a interferência das proteínas com o corante Coomassie Brilliant Blue G-250, em meio altamente ácido resulta em modificação proporcional da cor detectável em um comprimento de onda de 595 nm. A partir do cálculo da curva padrão de albumina, são obtidos os valores de concentração proteica.

### **3.8 Cultura celular**

#### **3.8.1 Linhagens L929 e B16F10**

As linhagens L929 (fibroblasto murino) e células tumorais B16F10 (melanoma murino) foram adquiridas da ATCC (American Type Cell Collection).

As células B16F10 foram desenvolvidas a partir do melanoma de pele em camundongos da linhagem C57BL/6J. A linhagem celular L929 é proveniente do tecido conjuntivo subcutâneo de camundongos C3H/Na. Ambos os tipos celulares são aderentes.

As células foram cultivadas seguindo os métodos tradicionais de cultivo celular e antes de atingirem confluência, foram subcultivadas para ampliação e congelamento em nitrogênio líquido. Sendo mantidas em meio RPMI com 10% de SFB (Soro Fetal Bovino), 1% (2 mM) de L-Glutamina e 1% de antibiótico e antimicótico estreptomicina (25 µg/mL), penicilina (50 U/mL), e anfotericina (1,25 µg/mL) GIBCO®. As células foram mantidas em estufa a 37°C, atmosfera úmida e com 5% de CO<sub>2</sub>.

#### **3.8.2 Congelamento**

As células L929 e B16F10 foram congeladas e estocadas em tanques de nitrogênio líquido em alíquotas de 1 x10<sup>6</sup> células/ mL em frascos criogênicos

estéreis de 2 mL, com tampa e rosca interna (Corning®). Utilizou-se uma solução de meio de congelamento com 10% de DMSO (Dimetilsulfóxido), 60% de meio de cultura RPMI e 30% de SFB.

### **3.8.3 Descongelamento**

Para o descongelamento, o frasco foi retirado do nitrogênio líquido e descongelado rapidamente em banho-maria a 37°C e adicionado a 1 mL de meio de cultura constituído de meio RPMI suplementado com 10% de SFB, para diluir o DMSO que é tóxico para as células a temperatura ambiente. Este volume foi transferido para um tubo Falcon de 15 mL com 4 mL de meio de cultura RPMI, o volume total de 5 mL foi centrifugado a 200G durante 5 minutos, ressuspendidas e semeadas na garrafa T75.

### **3.8.4 Plaqueamento**

Após o descongelamento as células foram transferidas para tubos de prolipropileno (Falcon) com 15 mL de meio de cultura e centrifugadas durante 5 minutos a 200G. O sobrenadante foi desprezado e o pellet ressuspendido em 3 mL de meio RPMI, em seguida realizada a contagem celular com o auxílio da câmara de Neubauer e  $5 \times 10^5$  células foram transferidas para as garrafas de 75 cm<sup>2</sup> e mantidas com 7 mL de meio de cultura RPMI com SFB 10% durante 48 horas para posterior tripsinização.

### **3.8.5 Tripsinização e repique**

Quando as células apresentavam aproximadamente 80% de confluência, era realizada a lavagem com tampão fosfato e adicionados 4 mL de tripsina-EDTA aquecida a 37°C, para o descolamento das células na garrafa, posteriormente foi adicionado 4 mL de meio de cultura RPMI com 10% de SFB, e as células foram centrifugadas a 200G e ressuspendidas. Em seguida,  $5 \times 10^5$  células foram transferidas para garrafas novas e adicionou-se 7 mL de meio RPMI.

## **3.9 Citotoxicidade e atividade proliferativa**

Os ensaios com as toxinas fracionadas e o veneno bruto foram feitos pelo Método Colorimétrico utilizando o corante vital MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium).

O teste de viabilidade celular avalia a toxicidade que um determinado material pode causar em contato com células em cultura. É baseado na avaliação quantitativa da viabilidade celular em exposição a agentes tóxicos, pela incubação

com corante vital MTS e reagente acoplador de elétrons, PMS (Phenazine Methosulfate). A quantidade de MTS, marcador de viabilidade celular, absorvido por uma população de células é diretamente proporcional ao número de células viáveis em cultura (Malich, 1997).

Em uma placa de 96 poços,  $1 \times 10^4$  células/poço foram plaqueadas contendo 100  $\mu\text{L}$  de meio RPMI suplementado com 10% de SFB. Após 24 horas, o meio dos poços foi trocado e 50  $\mu\text{L}$  de toxina em concentrações variáveis foi diluído em 50  $\mu\text{L}$  de meio de cultura. As placas foram incubadas por mais 24 horas a 37° C com 5% de  $\text{CO}_2$ .

Uma solução de 2 mL de MTS para cada 0,1 mL de PMS, diluída em 10 mL de meio de cultura foi produzida, e 120  $\mu\text{L}$  desta solução foi aplicado em cada poço da placa. As células foram mantidas incubadas em estufa de  $\text{CO}_2$  a 37° C durante 3 horas. Posteriormente, foi realizada a quantificação da absorvância em leitor de ELISA em comprimento de onda de 490 nm, e os cálculos de viabilidade para análises estatísticas de desvio padrão. Todos os ensaios de viabilidade celular foram realizados em quadruplicata. Foram determinados a atividade citotóxica do veneno e de seus componentes isolados nas células tumorais e fibroblastos murinos.

### **3.10 Identificação de proteínas símiles**

#### **3.10.1 Dot-Blot**

As frações citotóxicas foram submetidas a uma análise qualitativa por Dot Blot. A membrana de nitrocelulose previamente hidratada com PBS, foi mantida no aparelho de Blot de 96 poços, onde adicionou-se 100  $\mu\text{L}$  de cada amostra. Como controle positivo usou-se veneno total de *Bothrops jararaca*. Após a adsorção das mesmas, a membrana foi incubada durante uma hora com solução de bloqueio contendo 5% de leite liofilizado, desnatado (Molico, Nestlé). Posteriormente, a membrana foi incubada, overnight a 4°C, em solução de anticorpo primário policlonal de coelho anti-jararagina gentilmente cedido pela Dra. Splendore Della Casa, na diluição (1:5000). Após a lavagem da membrana com PBS, as mesmas foram incubadas com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:5000). Para a revelação, utilizou-se 25  $\mu\text{L}$  de peróxido de hidrogênio 30% e 10 mg de DAB (Diaminobenzidina) diluídos em 50 mL de PBS.

### 3.10.2 Western Blot

Após a separação eletroforética, as proteínas que apresentaram citotoxicidade foram transferidas em membrana de nitrocelulose durante 1 hora sob corrente de 90V. Para a realização da transferência foi utilizado um tampão contendo 192 mM de glicina, 25 mM de Tris, 0,037% de SDS (Sodium Dodecil Sulphate) e 10% de metanol, pH 8,3. Após a lavagem com PBS, a membrana foi incubada durante uma hora com solução de bloqueio contendo 5% de leite liofilizado, desnatado (Molico, Nestlé). Posteriormente, seguiu-se o procedimento citado anteriormente e como anticorpo primário utilizou-se o anti- jararagina na diluição (1:2500) e soro anti-crotálico (1:5000) e com o anticorpo secundário anti-IgG de coelho e anti IgG de cavalo conjugado com peroxidase (1:5000). Como controle positivo usou-se veneno total de *Bothrops jararaca* e *Crolalus durissus terrificus*.

### 3.11 Análise estatística

Todas as análises estatísticas foram realizadas utilizando o software GraphPad Prism 5.0, pelo método de variância Two way ANOVA, com análise de Bonferroni.

## 4. RESULTADOS

### 4.1 Primeira etapa de purificação do veneno de *C. vegrandis* e ensaio de atividade proliferativa

#### 4.1.1 Cromatografia de troca iônica e gel SDS PAGE 15%

Inicialmente, realizou-se a padronização do fracionamento do veneno total da cascavel *C. vegrandis*, em coluna de troca aniônica Mono Q, onde o melhor perfil cromatográfico obtido foi o indicado abaixo:

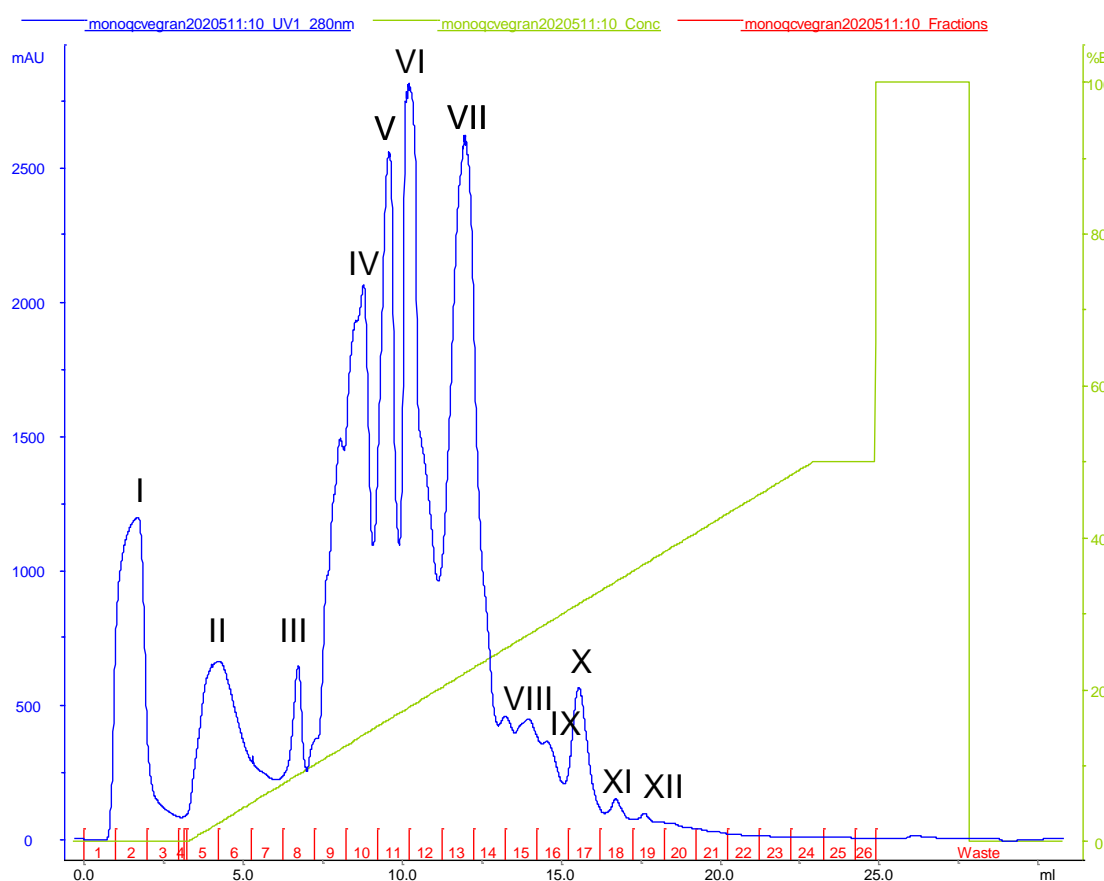


Figura 1 – Fracionamento do veneno total da *C. vegrandis* em coluna aniônica (Mono Q). Foram diluídos 15 mg de veneno em 1,2 mL de Tris 50 mM. Fluxo de 0,8 mL/min.

As proteínas foram separadas em função de sua carga, resultando em doze picos, contando a fração não adsorvida (proteínas básicas protonadas)

indicado pelo pico I, e as frações que apresentavam maior absorvância foram eluídas da coluna com aproximadamente 25% de NaCl. A cada dois fracionamentos sucessivos, coletou-se o pool de cada fração para a obtenção de uma quantidade viável de proteínas. No perfil cromatográfico, foi observado a presença de proteínas ácidas com elevada absorvância em 280 nm, sendo indicadas pelos picos majoritários IV ao VII. As proteínas foram eluídas em gradiente de 50% de Tris- HCl + NaCl 1M, pH 8,0.

Posteriormente, para a análise de pureza e tamanho molecular, foram produzidos géis de poliácridamida 15%. As amostras foram preparadas utilizando-se um tampão não redutor, e em cada poço foi aplicado um volume de 10 µL. Observou-se uma significativa quantidade de bandas com variadas massas moleculares, com o predomínio de proteínas com aproximadamente 50 kDa ou abaixo deste valor, conforme indicado na figura 2.

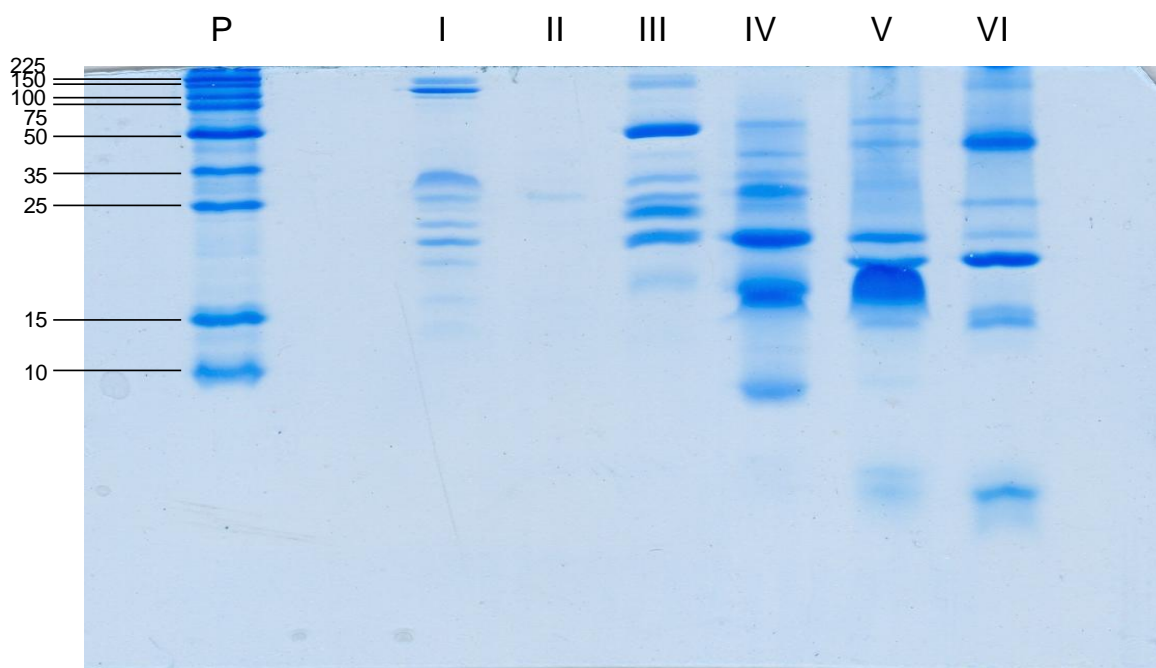


Figura 2 – Gel SDS PAGE 15 % das frações I-VI coletados na troca iônica. Foram aplicados 10 µL/poço de amostra em concentração de 1 mg/mL.

Todos os picos coletados na coluna de troca iônica foram submetidos à eletroforese. Na figura 3, pode-se visualizar as bandas equivalentes as frações VII à XII onde se observa a redução na quantidade de proteínas adsorvidas na coluna conforme ocorre um aumento no gradiente de NaCl.

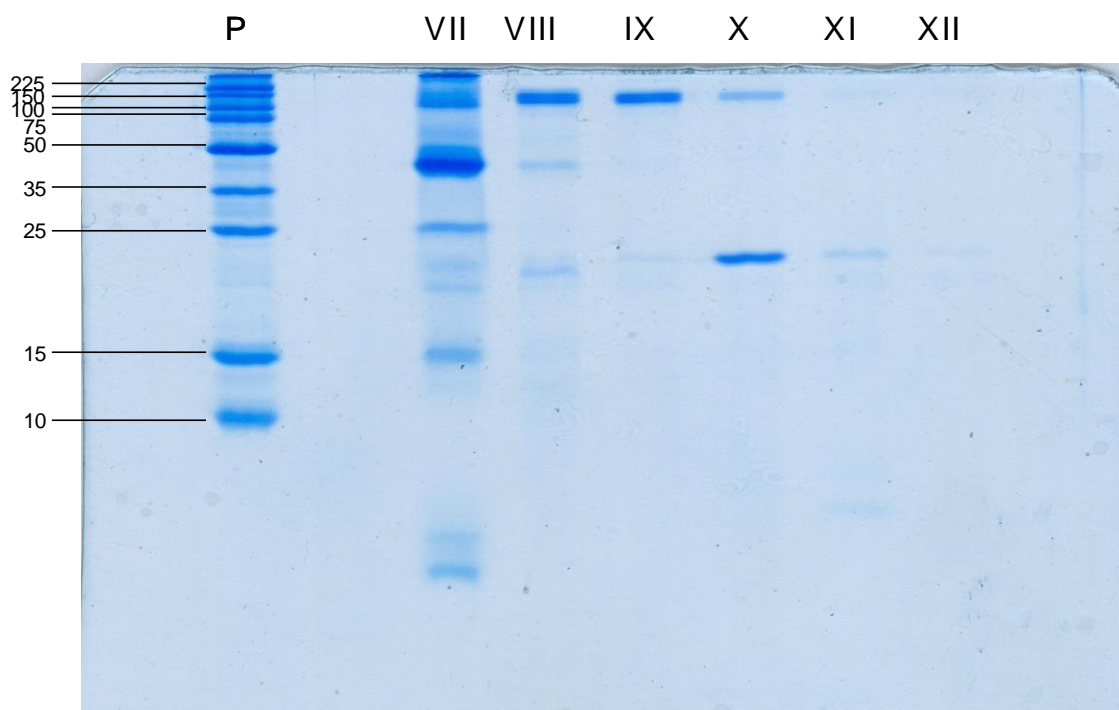


Figura 3 – Gel SDS PAGE 15 % das frações VII-XII coletados na troca iônica. Foram aplicados 10  $\mu$ L/poço de amostra em concentração de 1 mg/mL.

#### 4.1.2 Ensaio de viabilidade celular-MTS

No primeiro momento, foi realizado o ensaio de viabilidade celular, após a primeira etapa de purificação, utilizando-se frações recém-purificadas e frações previamente descongeladas, para uma análise qualitativa com o objetivo de identificar os picos citotóxicos em células B16F10, não levando em consideração as concentrações das amostras, como indicado na figura 4.

Todas as análises estatísticas foram realizadas, comparando as amostras recém-coletadas com o tampão Tris-HCl + NaCl 1M, pH 8,0, com o objetivo de observar a influência da solução tamponante na morte celular.

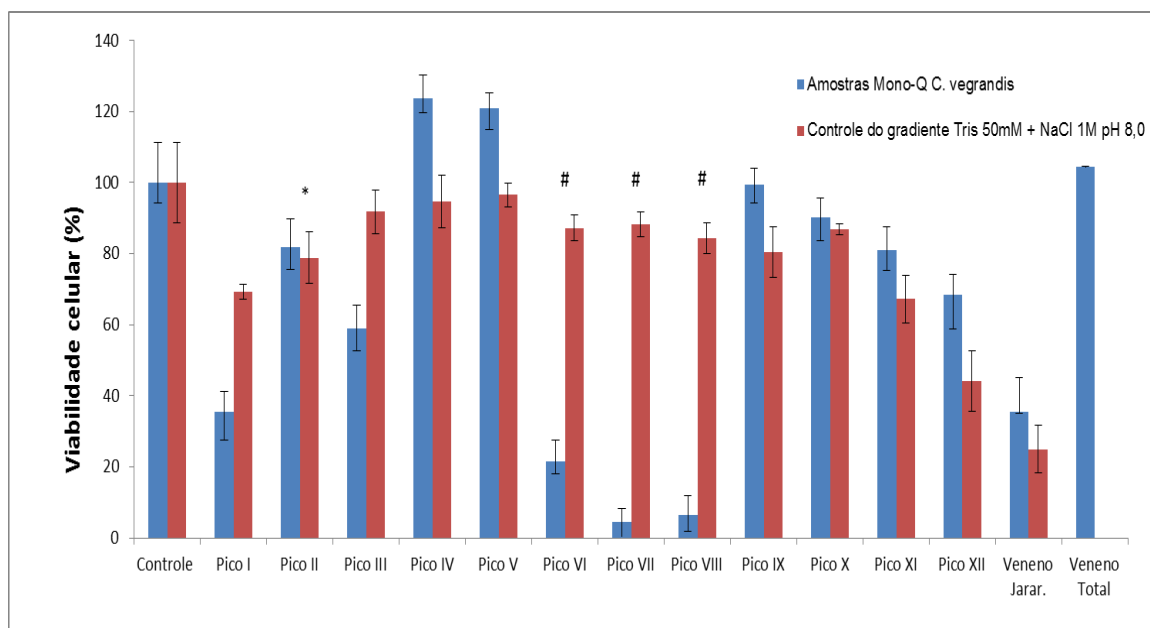


Figura 4 - Viabilidade celular dos picos I-XII coletados na coluna Mono Q e amostras do gradiente. 50  $\mu$ L de toxina com  $1 \times 10^4$  células por poço. \* representa análise estatística com  $p > 0,05$ . # indica as frações citotóxicas.

Pelos dados de viabilidade celular indicada no histograma acima, observa-se a presença de três frações citotóxicas, representado pelas frações VI, VII e VIII, indicando que a presença do sal não interferiu na toxicidade das proteínas. Curiosamente, o veneno total de *C. vegrandis* não apresentou atividade citotóxica em nosso ensaio.

Outra análise estatística realizada visava identificar as diferenças significativas quanto à citotoxicidade entre proteínas descongeladas e as que não passaram pelo processo de descongelamento. De acordo com nossos resultados, houve uma redução da citotoxicidade quando os ensaios foram realizados com frações submetidas ao congelamento e posterior descongelamento, conforme indicado na figura 5, sugerindo uma certa labilidade das frações ativas.

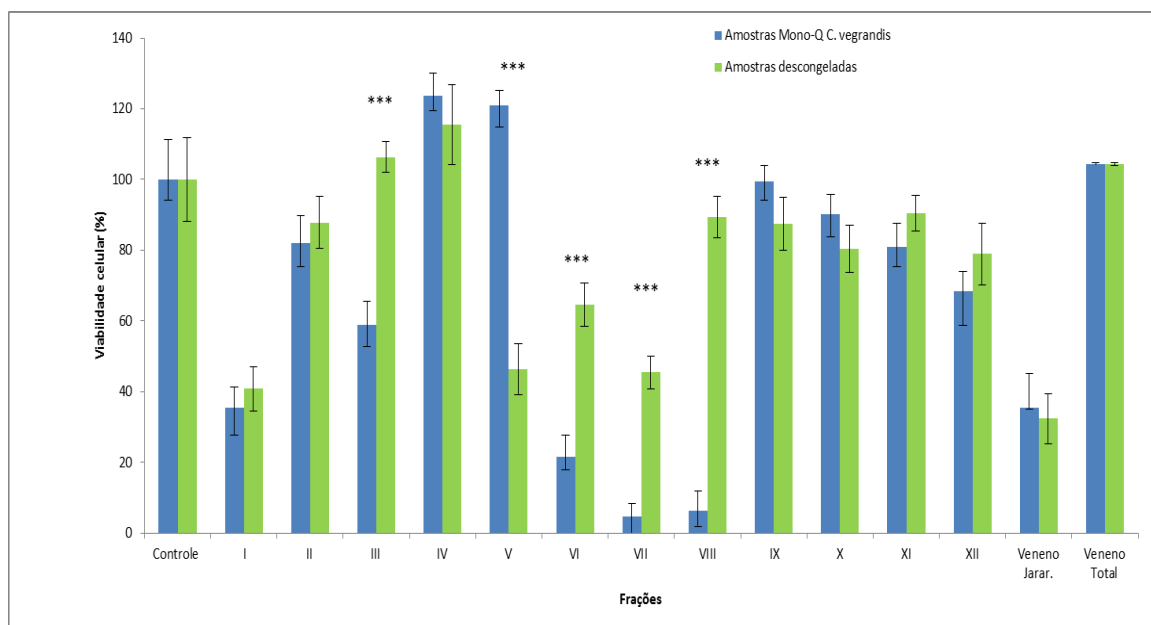


Figura 5 - Viabilidade celular dos picos I-XII coletados na coluna Mono Q com amostras descongeladas. 50  $\mu$ L de toxina com  $1 \times 10^4$  células por poço. \*\*\*  $p < 0,001$ , em relação a amostra fresca.

Apesar das frações citotóxicas apresentarem diferentes concentrações, pico VI (0,44 mg/mL), pico VII (0,49 mg/mL) e pico VIII (0,15 mg/mL), o último pico mostrou-se 3x mais citotóxico.

## 4.2 Segunda etapa de purificação do veneno de *C. vegrandis* e ensaio de atividade proliferativa

### 4.2.1 Cromatografia de exclusão molecular

Após a identificação dos picos citotóxicos, VI ao VIII (Mono Q), foi realizada a segunda etapa de fracionamento em coluna de Gel Filtração, onde as amostras foram previamente concentradas e dialisadas em membrana Amicon® Ultra Millipore de 3K, sendo injetados 100  $\mu$ L do concentrado de cada amostra, equivalente a quantidade total de proteína coletada na purificação de troca iônica (Figuras 6 a 8). Pela análise dos cromatogramas, observou-se a presença de proteínas com semelhantes massas moleculares, indicado pelo padrão no tempo de retenção dos eluatos.

Nesta segunda etapa de purificação, 100  $\mu$ L de amostra da fração citotóxica (VI) foram injetados na concentração de aproximadamente 0,85 mg/mL. No total, foram coletados dois picos que apresentavam elevada absorvância em 220 nm, indicando a presença de grande quantidade de ligações peptídicas e

baixa concentração de aminoácidos aromáticos, dada a baixa absorvância destes mesmos picos em 280 nm. Esta segunda etapa de fracionamento não foi o suficiente para obter proteínas puras, uma vez que ocorreu sobreposição entre os picos coletados.

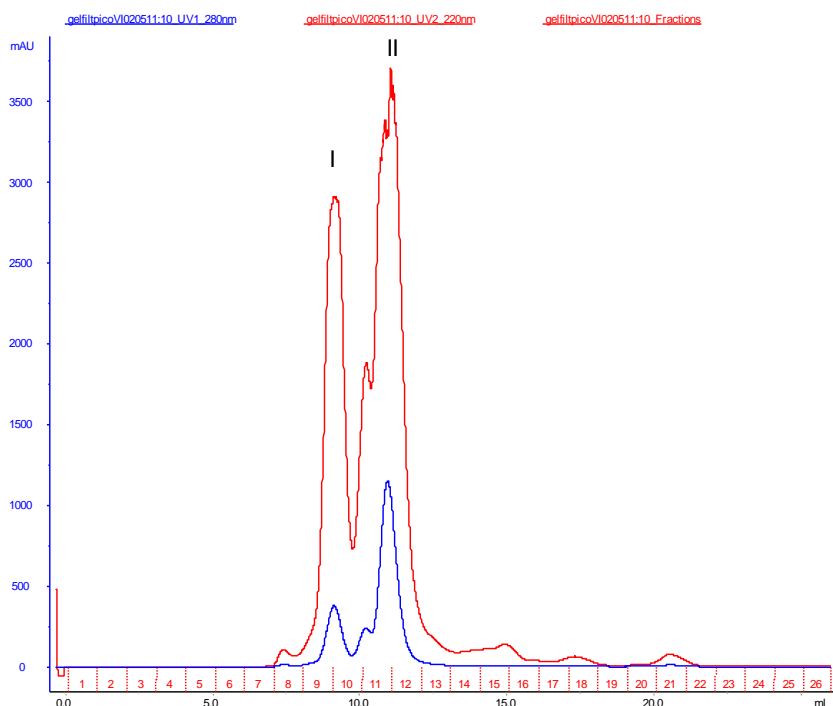


Figura 6 – Gel filtração do pico VI obtido na troca iônica (Mono Q). Foram aplicados 100  $\mu$ L em fluxo de 0,6 mL/min.

A figura 7 indica a purificação do pico citotóxico VII (Mono Q), onde 100  $\mu$ L de amostra, equivalente a 0,95 mg/mL foram injetados na coluna previamente ambientada com PBS e mantida em fluxo de 0,6 mL/min. A partir da análise do perfil, foram obtidos três frações que apresentavam tempo de retenção semelhante ao observado na purificação anterior.

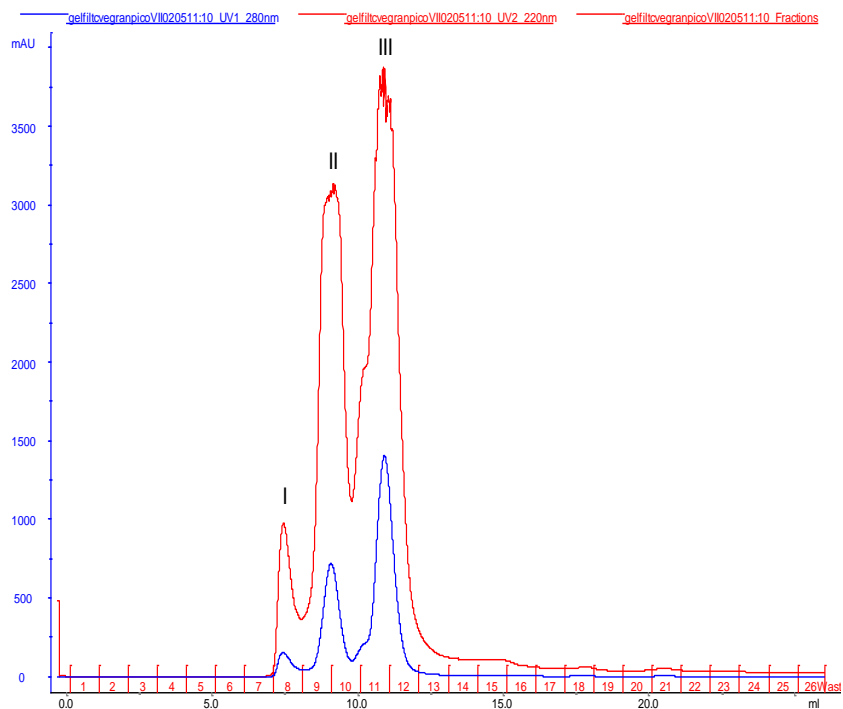


Figura 7 - Gel filtração do pico VII obtido na troca iônica (Mono Q). Foram aplicados 100  $\mu$ L em fluxo de 0,6 mL/min.

O cromatograma abaixo retrata a purificação do pico citotóxico VIII, recém-coletado da coluna de troca iônica (Mono Q), o volume injetado foi o mesmo citado anteriormente, em concentração de aproximadamente 0,45 mg/mL.

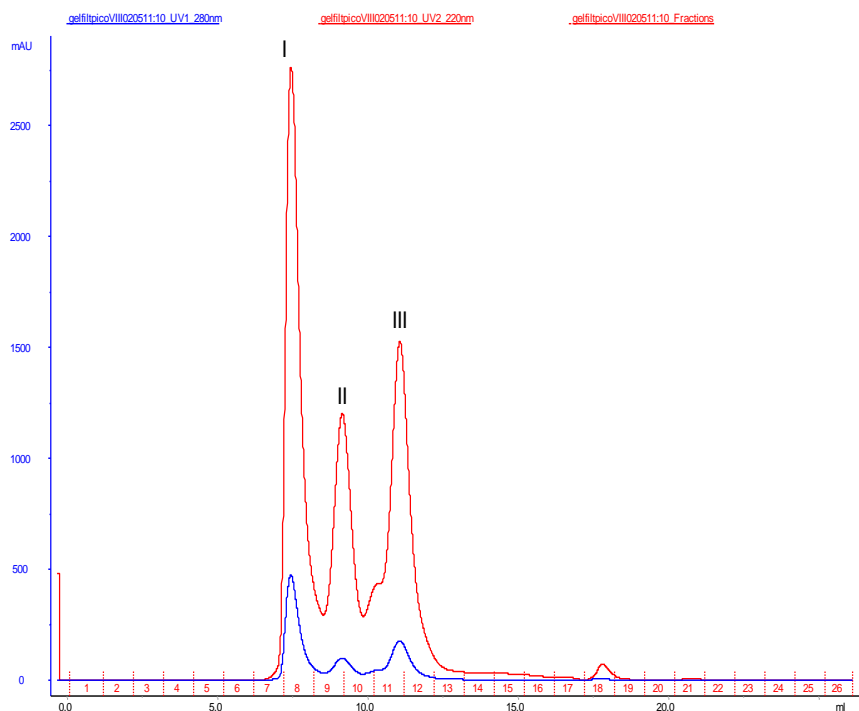


Figura 8 - Gel filtração do pico VIII obtido na troca iônica (Mono Q). Foram aplicados 100  $\mu$ L em fluxo de 0,6 mL/min.

Na figura 9 está o gel SDS PAGE 15 % das amostras obtidas após a segunda etapa de fracionamento em coluna de gel filtração, onde foram visualizadas proteínas com aproximadamente 100 kDa, 50 kDa e 25 kDa em praticamente todas as amostras submetidas á cromatografia de exclusão molecular, sendo esta última provavelmente a crotoxina símile.

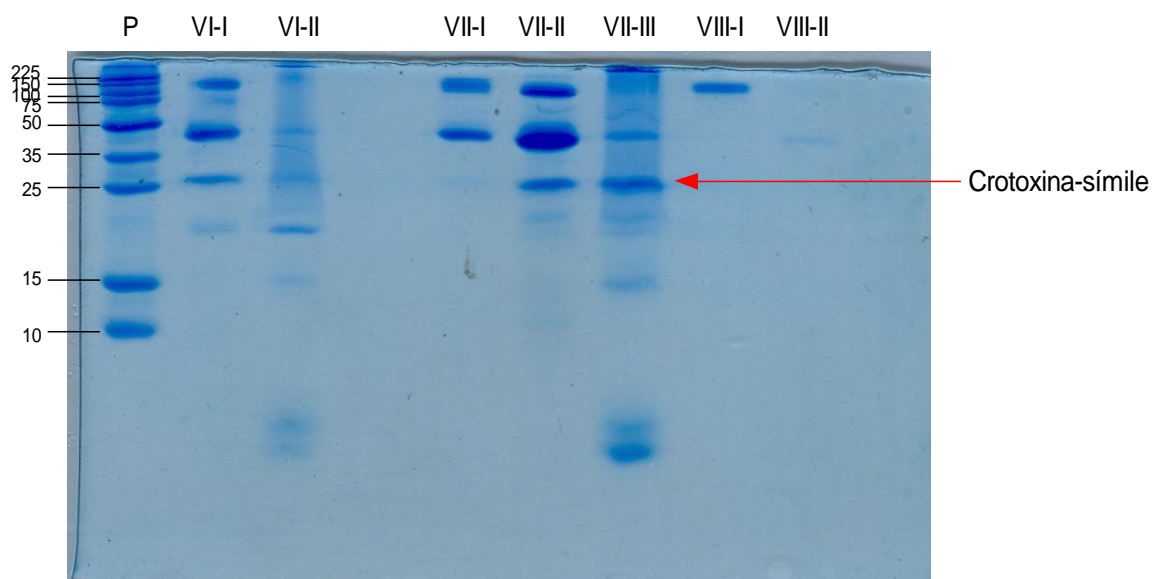


Figura 9 - Gel SDS PAGE 15% com os picos fracionados em coluna de Gel Filtração. Foi aplicado 10  $\mu$ L/poço de amostra em concentração de 0,3 mg/mL.

Visando confirmar se realmente tratava-se da crotoxina símile citada por Kaiser (1987), as amostras que apresentavam bandas de 25 kDa foram submetidas a um novo ensaio de eletroforese em gel (figura 10), juntamente com amostra de crotoxina de *Crotalus durissus terrificus*, recém-purificada, pelo método de exclusão molecular e de troca iônica, disponibilizada pela aluna de doutorado Karina Corleto de Oliveira.

No gel de poliacrilamida, observa-se majoritariamente a subunidade correspondente a fosfolipase A<sub>2</sub>, com 14 kDa.

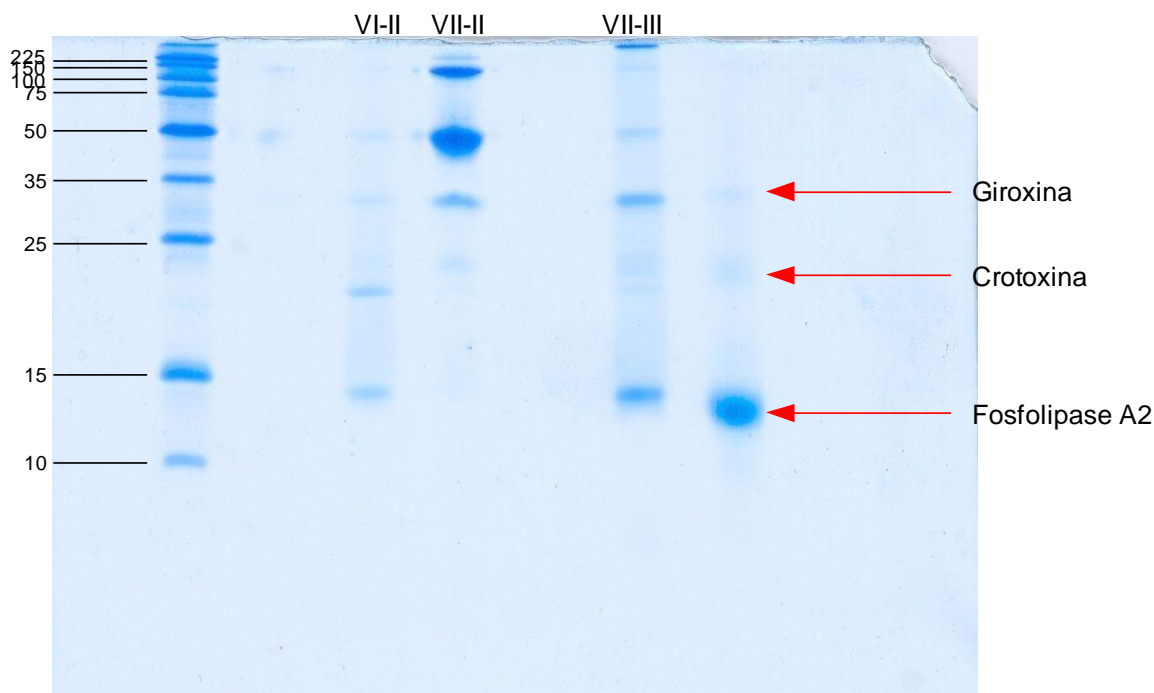


Figura 10 - Gel SDS PAGE 15% com os picos fracionados em coluna de gel filtração, com a amostra de crotoxina recém-fracionada.

Além da banda indicativa da presença da crotoxina símile nas frações citotóxicas, observa-se também a presença de proteínas de baixo peso molecular, que possivelmente podem ser fosfolipases.

#### 4.2.2 Ensaio de viabilidade celular das frações coletadas na coluna de exclusão molecular

Posteriormente, na segunda etapa de purificação em coluna de exclusão molecular, foram identificados dois picos com elevada citotoxicidade em células B16-F10, pico VI-I (0,33 mg/mL) e pico VII-II (0,39 mg/mL). A figura indica uma sutil diferença de toxicidade entre ambos os picos (figura11).

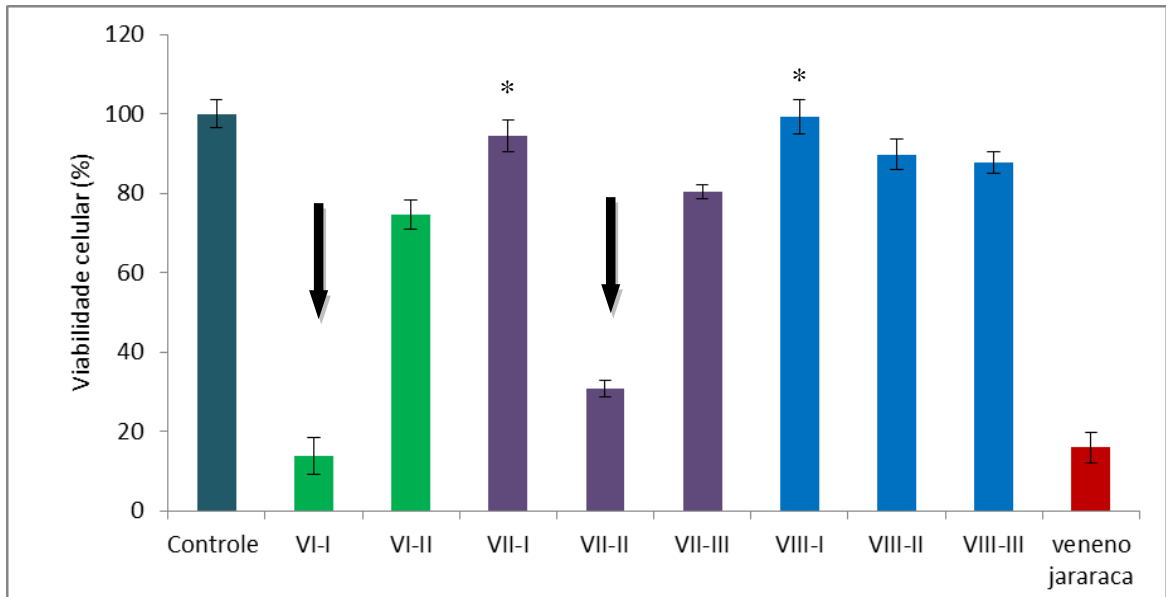


Figura 11 - Viabilidade celular das células B16F10 expostas por 24 horas aos picos coletados após cromatografia em coluna Superdex 75 10/300 GL. 50  $\mu$ L de toxina com  $1 \times 10^4$  células por poço. \*  $p > 0,05$ . As outras frações apresentam  $p < 0,001$ . As setas indicam os picos citotóxicos

No terceiro ensaio de viabilidade celular, enfocando a sensibilidade das células tumorais ao veneno semi-purificado, utilizou-se como controle a linhagem de murino L929 de fibroblasto norma, sendo aplicados 200  $\mu$ g/mL de proteínas em cada poço da placa, como mostrado na figura 12.

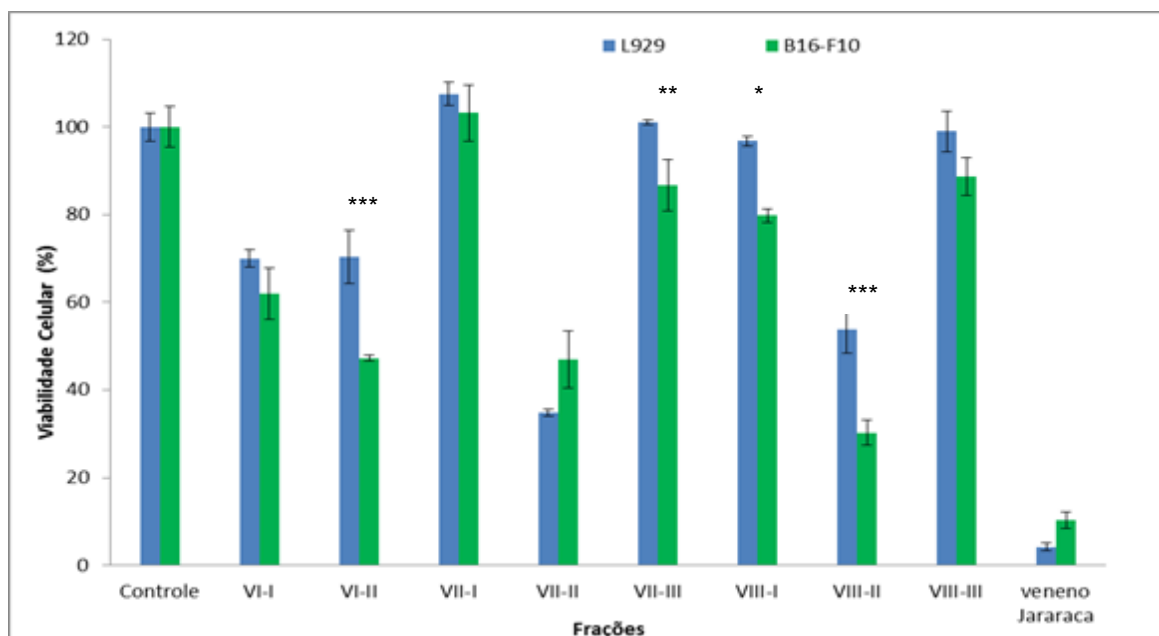


Figura 12 - Viabilidade celular das células B16F10 expostas por 24 horas aos picos coletados após cromatografia em coluna Superdex 75 10/300 GL. 200 µg/mL de toxina com  $1 \times 10^4$  células por poço. Veneno de jararaca como controle positivo. Azul: células controle L929. Verde: células B16-F10. \*\*\*  $p < 0,001$ . \*\*  $p < 0,01$ . \*  $p < 0,05$ .

Ao compararmos os dados obtidos nas figuras 11 e 12, observa-se uma redução da citotoxicidade tanto em células tumorais quanto nos fibroblastos de murino, o que pode ser justificado possivelmente pela redução da concentração proteica aplicada nas células, indicando que o seu efeito possivelmente é dose-dependente.

As células tumorais mostraram-se mais sensíveis à ação citotóxica do que os fibroblastos de murino, o que corrobora com os dados descritos na literatura. Todavia, no pico VII-II houve um comportamento distinto ao observado nos outros picos, onde as células L929 foram mais susceptíveis ao efeito tóxico do que as células tumorais B16F10, entretanto, este resultado não se mostrou estatisticamente significativo.

Além disso, as células sofreram alterações morfológicas, tornando-se mais arredondadas, exibindo perda de adesão e posteriormente redução de viabilidade celular indicado pelo ensaio com o reagente MTS, conforme indicado nas fotomicrografias.

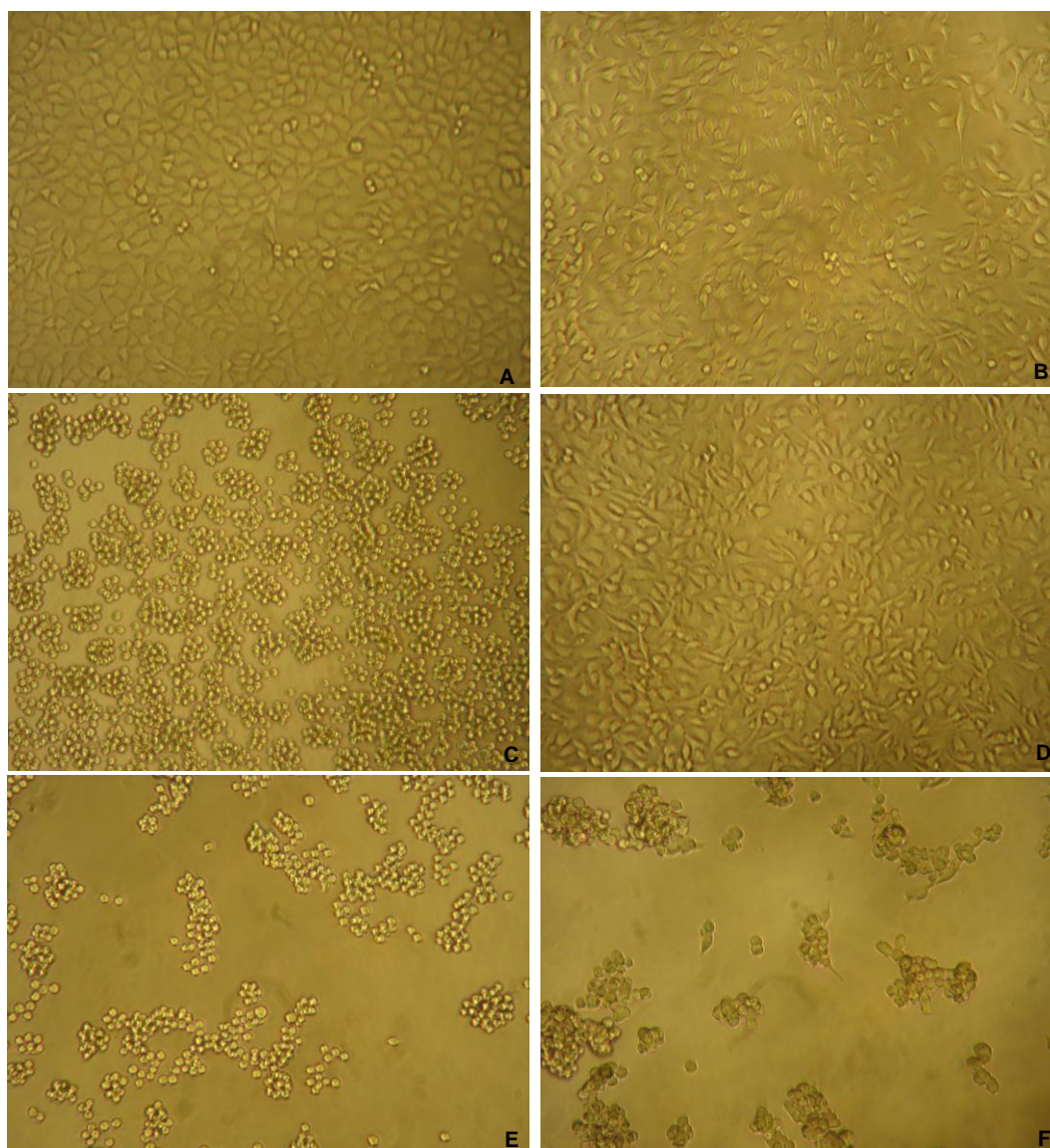


Figura 13 - Fotomicrografias das linhagens B16F10 e L929. A e B são células controle de ambas as linhagens, respectivamente. C e D células tratadas com a fração VI-II na concentração de 200µg/mL. E e F são células tratadas com a fração VII-II na mesma concentração. Aumento de 200x

A partir dos resultados obtidos foram identificados três frações com reduzidos percentuais de viabilidade celular, onde os picos VI-II e VIII-II apresentaram maior citotoxicidade em células B16F10.

### 4.3 Quantificação proteica

Ao aplicar os resultados da absorvância obtidos na fórmula e depois multiplicando-se pelo fator de diluição, obteve-se a dosagem protéica das frações submetidas ao ensaio de citotoxicidade, conforme indicado na figura 14.

Função f(X):

$$y=0,4449x+0,0083$$

$$R^2=0,9791$$

| Picos Mono-Q | Concentração (mg/mL) | Picos Gel filtração | Concentração (mg/mL) |
|--------------|----------------------|---------------------|----------------------|
| I            | 0,182                | I-VI                | 0,330                |
| II           | 0,013                | II-VI               | 0,485                |
| III          | 0,202                | I-VII               | 0,167                |
| IV           | 0,649                | II-VII              | 0,393                |
| V            | 0,658                | III-VII             | 0,387                |
| VI           | 0,444                | I-VIII              | 0,169                |
| VII          | 0,492                | II-VIII             | 0,113                |
| VIII         | 0,159                | III-VIII            | 0,160                |
| IX           | 0,123                |                     |                      |
| X            | 0,097                |                     |                      |
| XI           | 0,033                |                     |                      |
| XII          | 0,006                |                     |                      |

Figura 14-Tabela indicando a concentração de proteínas fracionadas nas etapas de purificação

#### 4.4 Western Blot das proteínas fracionadas por exclusão molecular

Devido aos estudos realizados que apontam evidências da influência de metaloproteinases na citotoxicidade, optou-se pela realização do ensaio imunoenzimático dos picos coletados na coluna de gel filtração, utilizando-se como anticorpo primário o anti-jararagina. Pela análise da membrana de nitrocelulose foi identificada a presença de metaloproteinases do tipo PIII, com diferentes intensidades das bandas com aproximadamente 50 kDa, e nos picos VIII-I e VIII-III não foi observado a presença de bandas, conforme indicado na figura 15.

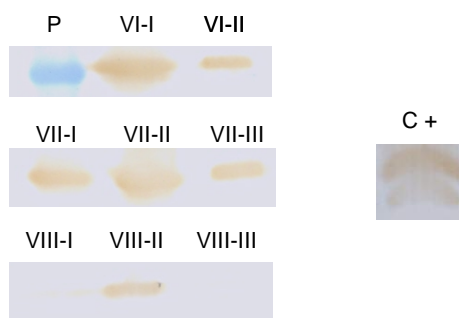


Figura 15 - Western Blot dos picos citotóxicos incubados com anticorpo policlonal anti-jararagina. Foi aplicado 10  $\mu$ L/poço de amostra em concentração de 0,3 mg/mL. Como controle positivo foi utilizado veneno de jararaca 2 mg/mL.

Além disso, os mesmos picos foram submetidos a uma outra análise, onde foram expostos ao soro anti-crotálico conforme figura 16.

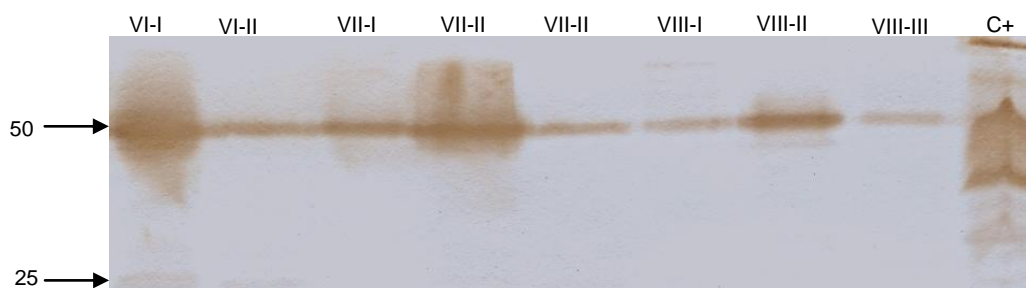


Figura 16- Western Blot dos picos citotóxicos incubados com anticorpo policlonal anti-crotálico. Foi aplicado 10  $\mu$ L/poço de amostra em concentração de 0,3 mg/mL. Como controle positivo foi utilizado veneno de cascavel 1 mg/mL.

Na membrana acima são observadas duas bandas reconhecidas pelo anticorpo anti-crotálico, onde a banda de aproximadamente 25 kDa possa ser a provável crotoxina símile.

#### 4.5 Sequenciamento de peptídeos por LC/MS/MS

Após a etapa de extração da banda de 50 kDa, a proteína isolada foi digerida com tripsina, enzima que cliva cadeias protéicas na região c-terminal dos aminoácidos arginina e lisina. Posteriormente, realizou-se a análise dos fragmentos por Espectrometria de Massa acoplada à cromatografia líquida (LC/MS/MS).

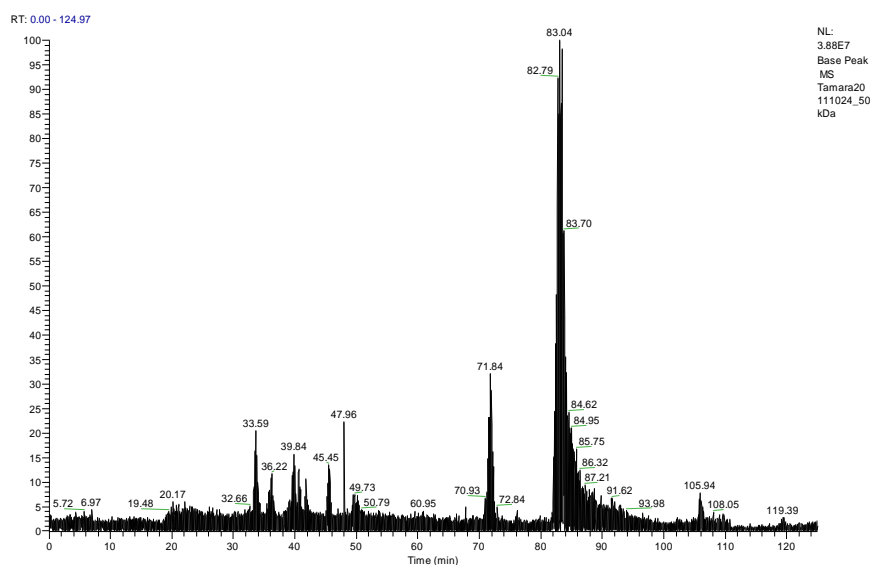


Figura 17- Perfil cromatográfico dos peptídeos obtidos da digestão triptica da banda citotóxica de 50 kDa.

Abaixo estão os múltiplos alinhamentos de sequências dos peptídeos obtidos com o predomínio de domínios associados à metaloproteinasas de diversas serpentes.

```

sp|Q2QA02|VM_CRODD C.durissus durissus          GHCVDVATAY
sp|A4PBQ9|VM2A_CROAT C.atrox                    GHCVDVATAY
sp|C9E1R8|VM3_CROVV C.viridis viridis           GHCVDVATAY
sp|Q90282|VM2B_CROAT C. atrox                  GHCVDVATAY
sp|O93523|VMBOF_BOTJA B.jararaca                GHCVDVATAY
sp|Q8QG88|VM6A_BOTIN B.insularis               GHCVDVATAY
sp|P30431|VMJAR_BOTJA B.jararaca                GHCVDVATAY
sp|P0C7B0|VMH6_AGKHB A. halys brevicaudus       GHCVDVATAY
tr|Q90Y44|Q90Y44_GLOHA G. halys                GHCVDVATAY
sp|Q9W6M5|VMACE_AGKAC A.acutus                 GHCVDVTTAY
tr|Q6Q274|Q6Q274_AGKAC A.acutus                GHCVDVTTAY
VIRT9740                                           GHCVDVATAY
*****:***

sp|Q2QA02|VM_CRODD          PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|A4PBQ9|VM2A_CROAT       PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|C9E1R8|VM3_CROVV        PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|Q90282|VM2B_CROAT       PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|O93523|VMBOF_BOTJA      PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|Q8QG88|VM6A_BOTIN       PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|P30431|VMJAR_BOTJA      PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|P0C7B0|VMH6_AGKHB       PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
tr|Q90Y44|Q90Y44_GLOHA     PEDVKCGRLYCKDNSPGQNNPCKMFYSNEDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
sp|Q9W6M5|VMACE_AGKAC      SEDVKCGRLYCKDDSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
tr|Q6Q274|Q6Q274_AGKAC     SEDVKCGRLYCKDDSPGQNNPCKMFYSNDDEHKGMVLPGTKCADGKVCNS
VIRT9740                    -----KDNSPGQNNPCKMKG-----MVLPGTKC---KVCSN
                               **:*****.***                *****

```

Figura 18- Sequências de peptídeos organizados no formato FASTA da proteína de 50 kDa digerida com tripsina e extraída do gel SDS PAGE. \* aminoácidos idênticos, : aminoácidos homólogos, . aminoácidos de baixa homologia.

As sequências obtidas foram submetidas à análise pelo MASCOT e se obteve o seguinte histograma onde a região hachurada representa áreas não alinhadas com os peptídeos identificados pelo LC/ MS/MS.

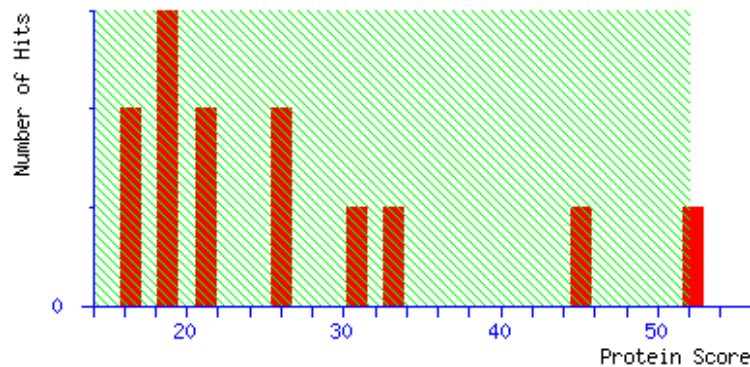


Figura 19-Histograma produzido pelo MASCOT de alinhamento dos peptídeos obtidos pelo LC/ MS/MS.

O resultado indicou um alinhamento entre as sequências significativamente baixo, aproximadamente 40%, onde a espécie com maior homologia entre as sequências foi a serpente *C. durissus durissus*.

Nominal mass ( $M_r$ ): **70470**; Calculated pI value: **5.06**  
 NCBI BLAST search of [VM CRODD](#) against nr  
 Unformatted [sequence string](#) for pasting into other applications

Taxonomy: [Crotalus durissus durissus](#)

Fixed modifications: Carbamidomethyl (C)

Variable modifications: Oxidation (M)

Cleavage by Trypsin: cuts C-term side of KR unless next residue is P

Sequence Coverage: **15%**

```

1  MIQVLLVTIC LAALPYQGSS IILESGNVND YEIVYPRKVT ALPKGAVQPK
51  YEDAMQYELK VNGEPVLYL EKNKQLFSKD YSETHYSPDG REITTYPLVE
101 DHCYYHGRIE NDADSTASIS ACNGLKGFHK LQGEMYLIEP LKLSNSEAHA
151 VYKYENVEKE DEAPKMGCVT QNWKSYEPIK KASQLVVTAE HQKYNPFRFV
201 ELVLVVDKAM VTKNDDLDK IKTRMYELAN TVNEIYRYMY IHVALVGLI
251 WSNEKIDTVK PEAGYTLNAF GEWRKTDLLT RKKHDNAQLL TAIDLDRVIG
301 LAYVGSMCHP KRSTGIIQDY SPINLVVAVI MAHEMGNLIG IHHDGVCSC
351 GDYACIMRPE ISPEPSTFFS NCSYFDCWDF IMNQNEPECIV NEPLGTDIIS
401 PPVCGNELLE VGEECDGTP ENCQNECCDA ATCKLKSGSQ CGHGDCCEQC
451 KFSKSGTECR ASMSECDPAE HCTGQSSECP ADVFHKNGQP CLDNYGYCYN
501 GNCPIMYHQC YDLFGADVYE AEDSCFERNQ KGNYYGYCRK ENGNKIPCAP
551 EDVKCGRLYC KDNSPGQNNP CKMFYSNEDE HKGMVLPGTK CADGKVCSNG
601 HCVDVATAY

```

Figura 20- Resultado obtido pelo MASCOT onde os aminoácidos em vermelho representam os peptídeos identificados na análise por LC/MS/MS

Os peptídeos homólogos encontrados em ambas as serpentes foram organizados na tabela abaixo, onde estão indicadas as posições e domínios de cada sequência.

| Peptide           | Position | Domain         |
|-------------------|----------|----------------|
| VNGEPVLYL EKNK    | 61-74    | Propeptide     |
| FVELVLVVDK        | 199-207  | Peptidase M12B |
| TDLLTR            | 276-281  | Peptidase M12B |
| KKHDNAQLL TAIDLDR | 282-297  | Peptidase M12B |
| VIGLAYVGS MCHPK   | 298-311  | Peptidase M12B |
| DNSPGQNNPCK       | 562-572  | Cysteine-rich  |
| GMVLPGTK          | 583-590  | Cysteine-rich  |
| VCSNGHCVDVATAY    | 596-610  | Cysteine-rich  |

Figura 21- Sequência de peptídeos adquiridos na análise da banda de 50 kDa por LC/MS/MS, indicando as posições e os domínios encontrados na metaloproteinase PIII de *C. d. durissus*.

#### 4.6 Cromatografia de afinidade e gel SDS PAGE

A partir dos resultados mostrados nos ensaios de viabilidade celular, optou-se em realizar o fracionamento do veneno bruto com o objetivo de isolar as prováveis metaloproteínas responsáveis pelo efeito nocivo observado nas células. Para isso, a solução contendo o veneno bruto foi aplicada a resina onde as proteínas que apresentavam afinidade pelo metal se ligaram a matriz, indicado pelo pico II, e as que não apresentavam esta característica foram liberadas na fração não adsorvida representada pelo pico I. A maioria das metaloproteínas foi removida da coluna com aproximadamente 30% do gradiente de imidazol 100 mM, conforme figura 22.

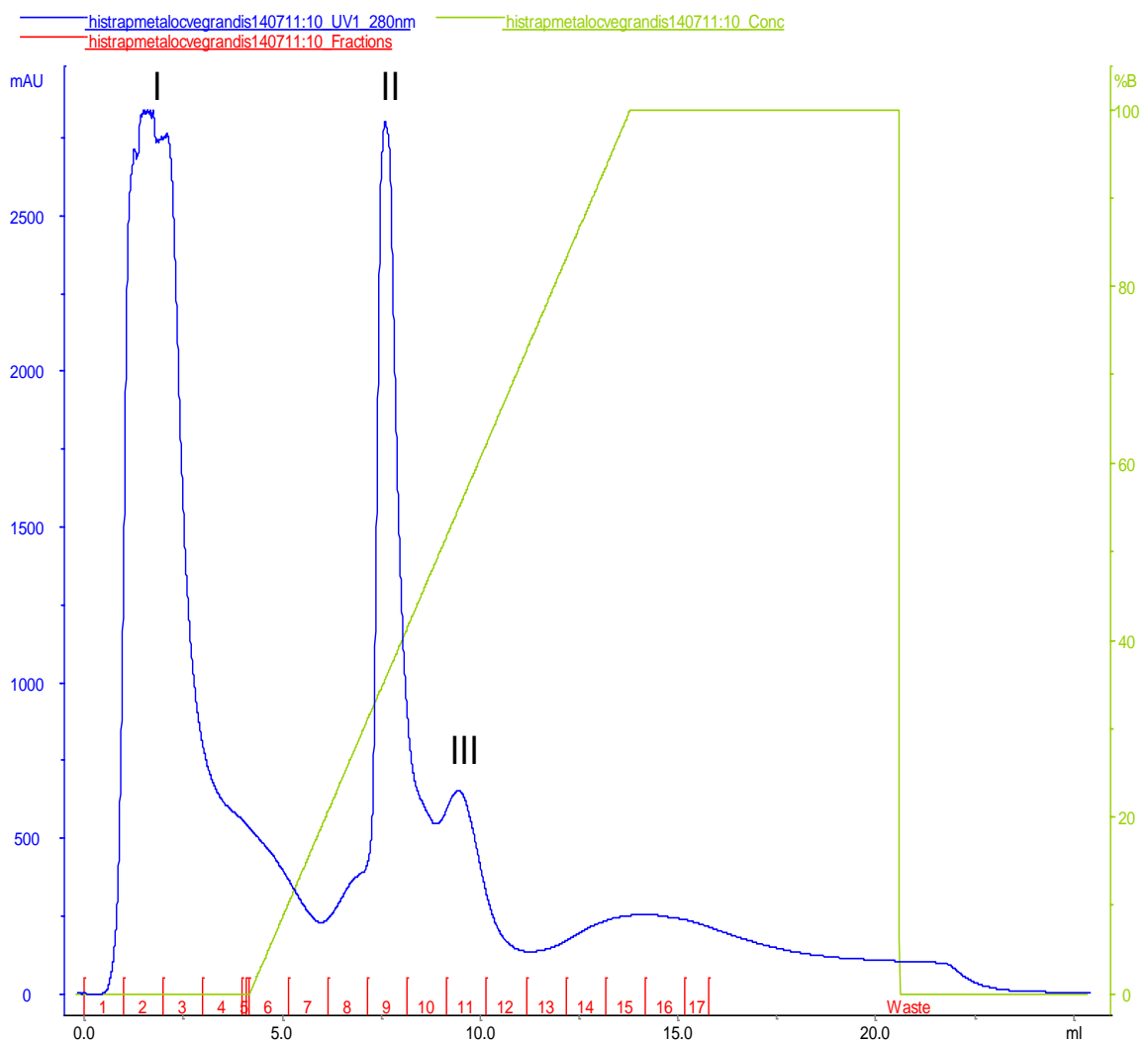


Figura 22 – Fracionamento em coluna Histrap HP 1 mL. Foram aplicados 15 mg de veneno total mantidos em fluxo de 0,6 mL/min.

Posteriormente, as amostras foram submetidas à eletroforese em gel de poliacrilamida 12%, utilizando um tampão não redutor, como mostra a figura 23.

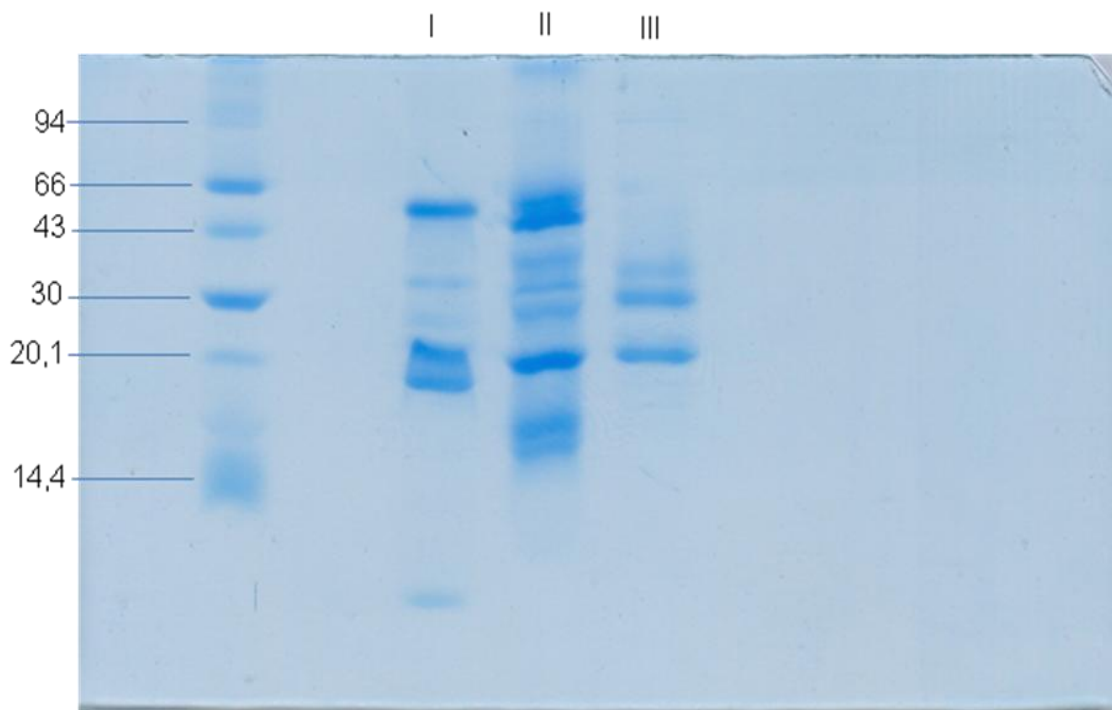


Figura 23- Gel SDS Page 12% com amostras coletadas no fracionamento em coluna de afinidade. Foram aplicados 10  $\mu$ L/poço.

Pelo gel pode-se observar diversas bandas na fração equivalente a metaloproteinase, indicando proteínas com variadas massas moleculares retidas na coluna.

#### 4.6.1 Western Blot das proteínas fracionadas por afinidade

Para a identificação das proteinases presentes nas frações coletadas no fracionamento por afinidade, foi realizado um novo ensaio imunoenzimático onde se utilizou o mesmo anticorpo primário policlonal anti-jararagina.

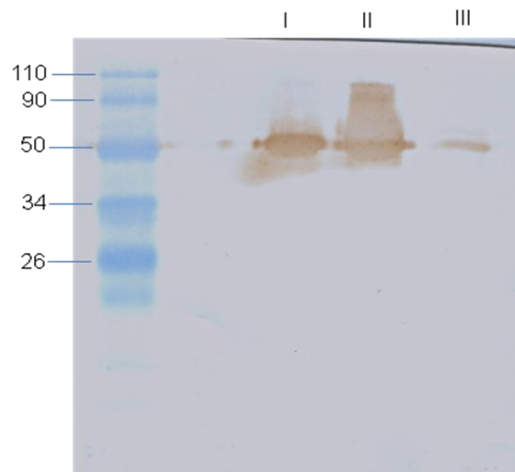


Figura 24- Western Blot dos picos fracionados na coluna de afinidade. Foi aplicado 10  $\mu$ l/poço.

Pela análise do ensaio, observa-se a presença de grande quantidade de metaloproteinases reconhecidas pelo anticorpo policlonal no veneno de *C.vegrandis*, onde em todas as frações houve a adsorção de metaloproteinases na coluna de afinidade.

#### 4.6.2 Atividade proteolítica por zimografia

Para confirmar a hipótese da presença de proteases no veneno de *C.vegrandis*, foi realizado o ensaio gelatinolítico. Pela análise do gel, observa-se a presença de enzimas proteolíticas nos três picos coletados na coluna de afinidade, ao redor das bandas observa-se a presença de halos que representam a degradação da gelatina provocada ação proteolítica das amostras aplicadas, conforme indicado na figura 25.

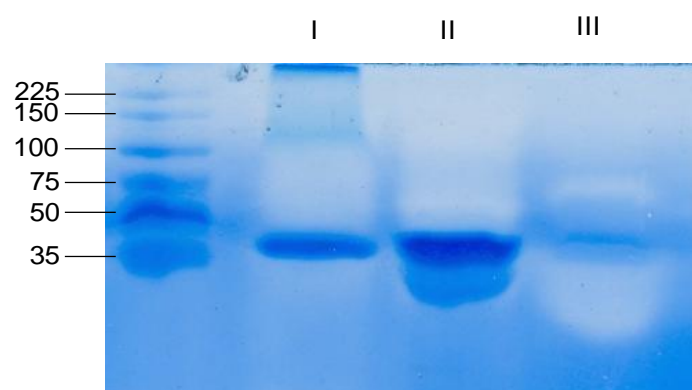


Figura 25 - Zimografia das amostras coletadas no fracionamento em coluna de afinidade carregada com  $Zn^{2+}$ . Foi aplicado 10  $\mu$ L de amostra em cada poço. Como controle positivo foi utilizado veneno de jararaca na concentração de 2 mg/mL.

#### 4.7 Perfil comparativo dos venenos de *Crotalus vegrandis* e *Crotalus durissus terrificus*

Um ensaio comparativo foi realizado com o veneno total da cascavel brasileira *Crotalus durissus terrificus*, mantendo-se todos os padrões utilizados para o fracionamento em coluna de troca aniônica Mono Q, anteriormente para a *C. vegrandis*, como indicado na figura 26.

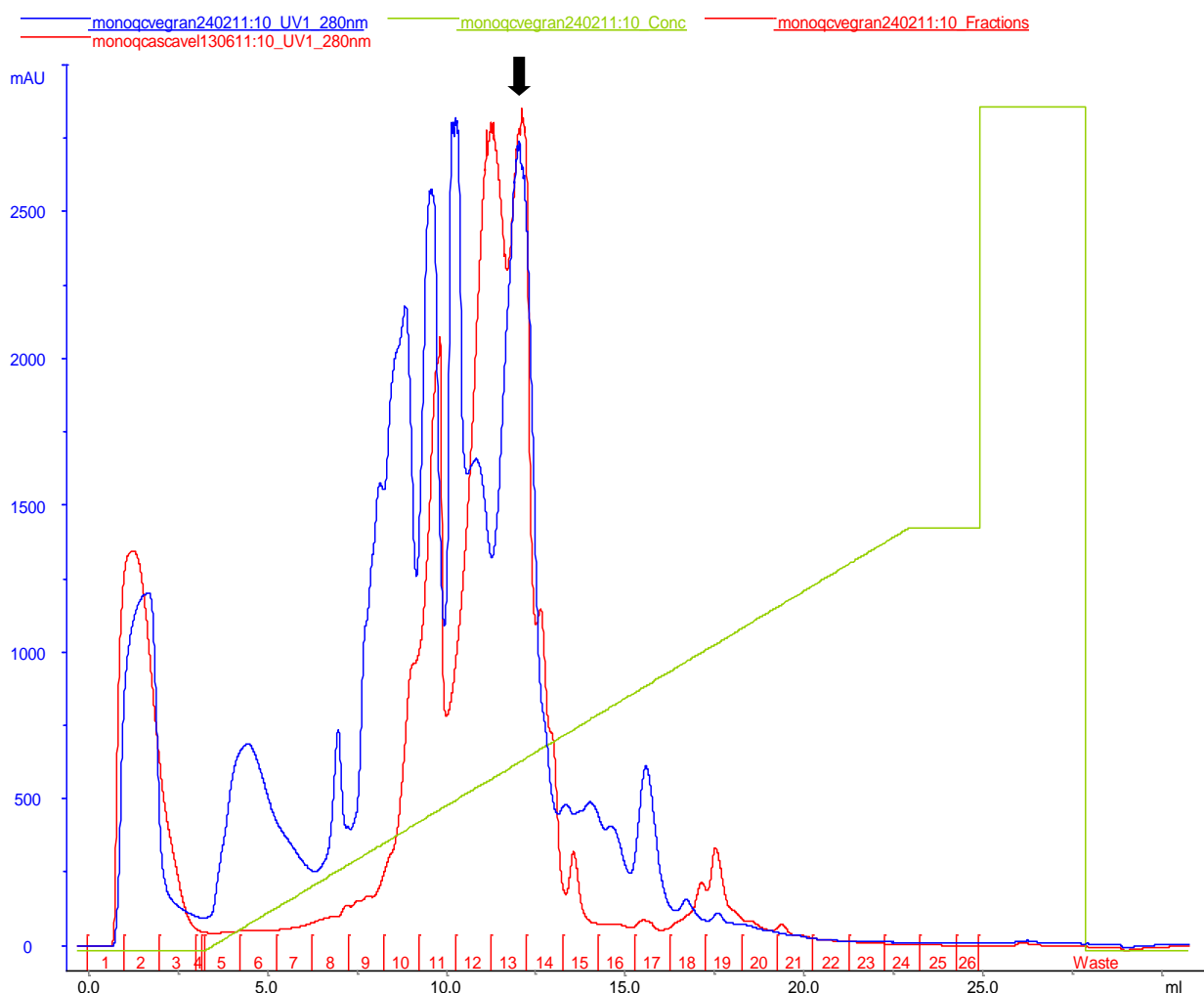


Figura 26 - Fracionamento do veneno total em coluna aniônica (Mono Q). Foram diluídos 15 mg de veneno em 1,2 mL de Tris 50 mM. Fluxo de 0,8 mL/min. Veneno total de *C. vegrandis*, em azul, e *C.d.terrificus*, em vermelho.

No perfil cromatográfico mostrado acima foi possível observar as semelhanças encontradas entre os venenos de ambas as espécies de cascavéis. Entretanto, é evidente a maior quantidade de frações apresentadas pelo cromatograma da *C. vegrandis*, mostrando uma maior diversidade de componentes no veneno da cascavel venezuelana. A sobreposição dos picos

indicados pela seta na figura acima (o pico majoritário do veneno de *C.d. terrificus*), indica que o veneno de *C. vegrandis* apresenta um componente com comportamento cromatográfico similar ao da crotoxina, corroborando com os achados de Kaiser *et al.* (1987).

Ao realizar o ensaio imoenzimático, utilizando-se como anticorpo primário o soro anti-crotálico, (figura 27), nota-se um vasto leque de componentes de ambas as amostras que compartilham identidade imunológica, apesar destes venenos induzirem manifestações clínicas bastante distintas.

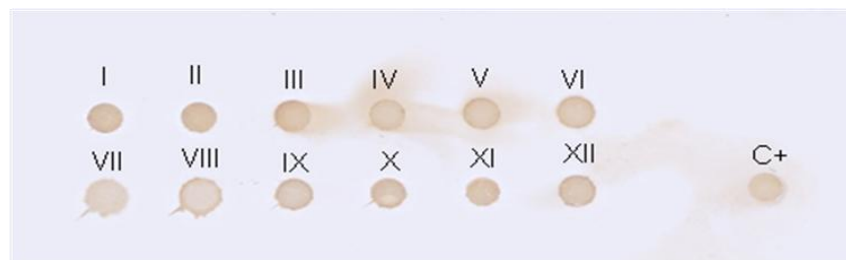


Figura 27- Dot Blot das amostras coletadas na purificação em coluna Mono Q. Como controle positivo utilizou-se veneno bruto de *C.d. terrificus*, na concentração de 1mg/mL, como anticorpo primário utilizou-se soro anti-crotálico.

Posteriormente, para a identificação das bandas que apresentam similaridade com o veneno crotálico foi realizado o ensaio de Western Blot, onde utilizou-se o mesmo anticorpo primário (figura 28).

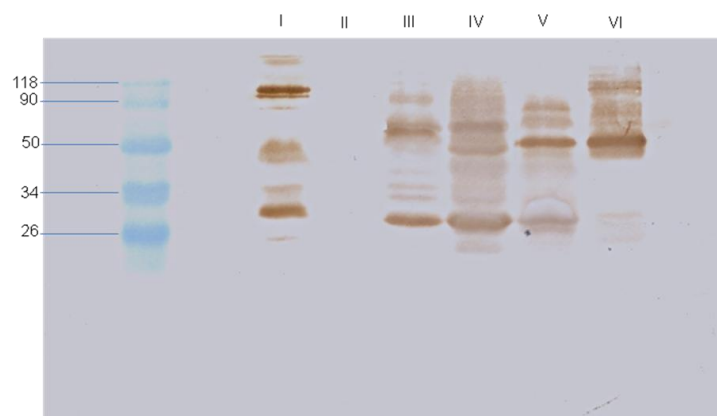


Figura 28- Western Blot das frações I-VI coletadas na etapa de purificação em coluna de troca iônica (Mono Q). Como anticorpo primário utilizou-se soro anti-crotálico.

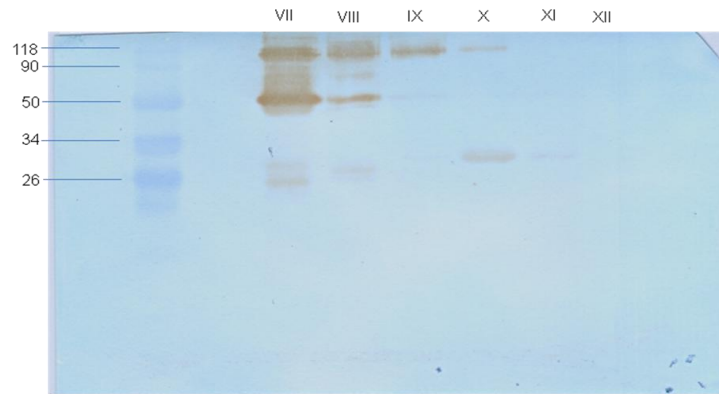


Figura 29- Western blot das frações VII-XII coletadas na etapa de purificação em coluna de troca iônica (Mono Q). Como anticorpo primário utilizou-se soro anti-crotálico.

Pela análise das figuras 28 e 29, foi identificada alta similaridade imunológica entre os componentes do veneno de *C.vegrandis* e da cascavel brasileira, onde se observa o reconhecimento da maioria das bandas protéicas visualizadas no gel SDS PAGE.

## 5. DISCUSSÃO

As toxinas do veneno de serpentes apresentam componentes ativos com elevado potencial terapêutico (Bennacef-Heffar e Laraba, 2003). Alguns venenos contêm toxinas que apresentam a capacidade de se ligar a integritas e interferir na ligação célula-célula ou célula-matriz.

Chaim-Matyas e Ovadia em 1987 observou que alguns venenos de Viperidae quando aplicados em células B16F10 induziram redução dos processos celulares, levando a perda de adesão aos seus substratos. As células sofreram uma alteração morfológica, tornando-se arredondadas, formando agregados e finalmente morrendo. Entretanto, componentes tóxicos encontrados em *Vipera russelli* e *Vipera palaestinae*, não apresentaram citotoxicidade nesta linhagem celular. Os mesmos autores, observaram em experimentos realizados *in vitro* e *in vivo*, que os venenos foram citotóxicos contra células B16F10 e células de condrosarcoma murino nas famílias Elapidae (*Naja naja atra*, *Naja naja naja* e *Naja nigricolis*), Crotalidae (*Trimeresurus flavoviridis*) e Viperidae (*Bitis arietans*, *Echis colorata*, *Pseudocerastes fieldi*, *Vipera ammodytes*, *Vipera bornmuelleri*, *Vipera palaestinae*, *Vipera radii* e *Vipera xanthina*).

Lipps e colaboradores em 1994 avaliaram o efeito antitumoral dos venenos de duas espécies de serpentes; *Crotalus atrox* e *Naja naja kaouthia*. Ao fracionar os venenos, todos os picos foram testados quanto a sua atividade biológica em células de mieloma murino, e as que apresentaram maior atividade citotóxica foram isoladas e nomeadas atroporina e kaotree das serpentes *Crotalus atrox* e *Naja naja kaouthia*, respectivamente. Além disso, a atroporina e kaotree foram testadas isoladamente ou em associação, mostrando efeitos tóxicos em vários tipos de células tumorais humanas (mama, cólon, fígado e ovário) e tumores animais como o mieloma de murino. A combinação de atroporina e kaotree exibiu maior atividade antitumoral do que as frações isoladas, indicando sinergismo e possivelmente diferentes moléculas alvo nas células tumorais. Os

mesmos autores ao realizarem estudos *in vitro* para avaliar o efeito citotóxico dessas proteínas observaram a redução de viabilidade em todas as linhagens utilizadas, não mostrando efeito citotóxico sobre as células normais utilizadas nos experimentos.

No presente trabalho, as proteínas foram fracionadas a partir de seus pontos isoelétricos, em coluna de troca aniônica (Mono Q), visando a separação de proteínas ácidas. Ao realizar o ensaio de viabilidade celular inicial, as células foram tratadas durante 24 horas e posteriormente as frações foram retiradas e o meio de cultura RPMI com o MTS foi aplicado e observou-se a presença de três picos que apresentavam citotoxicidade em células B16F10, indicados pelos picos VI ao VIII. Dados da literatura (Leung *et al.*, 1976) mostram a importância do contato contínuo do veneno com as células tumorais para a obtenção de um efeito antitumoral.

O mesmo autor relatou que a cardiotoxina de *Naja sp.* mostrou um efeito citotóxico em tumor ascítico de Ehrlich e que a citólise progressiva ocorre devido à presença de veneno continuamente. Esta atividade citolítica é completamente interrompida se a toxina for removida.

Um fato interessante observado foi à ausência de citotoxicidade apresentado pelo veneno total. Acreditamos que tal fato se deve à presença de inibidores endógenos no veneno como citrato, e tripeptídeos inibidores de metaloproteinases (Marques-Porto *et al.*, 2008).

Uma das principais propriedades do veneno animal é matar ou imobilizar a presa em alguns segundos. Por outro lado, as toxinas são enzimas proteolíticas que se mantêm na conformação inativa dentro da glândula de veneno tornando-se ativas somente ao serem injetadas na presa. Portanto, existem mecanismos que são responsáveis por tais regulações.

O citrato é um componente majoritário do veneno ofídico, as formas complexadas do citrato se ligam fortemente íons divalente como a  $\text{Ca}^{2+}$ ,  $\text{Mg}^{2+}$  e  $\text{Zn}^{2+}$ , o que possibilita que o citrato presente no veneno seja suficiente para inibir enzimas que são dependentes desses metais para sua atividade. Por isso, a serpente pode se proteger contra os próprios efeitos tóxicos do complexo proteico encontrado no veneno. Quando o veneno é injetado na presa, a concentração de

citrato é diluído e as enzimas tornam-se ativas por ligação a íons metálicos. Algumas enzimas são dependentes, sobretudo de íons divalentes como a fosfolipase A<sub>2</sub> Ca<sup>2+</sup> dependente (Slothoom *et.al.*, 1982), fosfodiesterase Mg<sup>2+</sup> dependente, fosfatase alcalina Mg<sup>2+</sup> ou Ca<sup>2+</sup> dependente (Iwanaga e Susuki, 1979) e proteinase dependente de Zn<sup>2+</sup> (Bjarnason e Fox, 1989; Francis *et.al.*, 1992), ou a dissociação de complexos proteicos durante o fracionamento do veneno, expondo domínios ativos, antes mascarados no veneno bruto.

O veneno de *Bothrops jararaca* apresenta atividade inibitória que previne a autoproteólise e/ou digestão do tecido glandular, onde existem três mecanismos são responsáveis pela inibição de metalopeptidases presentes no veneno bruto, que são a quelação de cálcio citrato, pH ácido e inibição enzimática competitiva pela tripeptídeo Pyroglutamyl-lisil-triptofano (Marques-Porto *et.al.*, 2008).

As frações citotóxicas que foram submetidas ao processo de descongelamento sofreram uma redução de citotoxicidade, que supostamente é justificado pela elevada atividade autoproteolítica apresentada por algumas PIII. O processo de autólise em algumas PIII já foi descrito na literatura. Estudos mostram que sem a adição de cálcio, metaloproteinases PIII sofrem autólise, formando uma molécula de 43 kDa, liberando os domínios DC, como é o caso das proteínas brevilisina H6, uma PIII isolada do veneno da serpente *Gloydus halis brevicaudus* (Fujimura *et.al.*, 2000), a catrocolastatina, PIII do veneno de *Crotalus atrox* (Shimokawa, *et.al.*, 1997) e a jararagina de *Bothrops jararaca*, que é susceptível à clivagem, na qual domínios disintegrina e rico em cisteína permaneceriam ligados a uma parte do domínio metaloproteinase por pontes dissulfeto, portanto, levando a uma alteração conformacional, dando origem a uma forma instável chamada jararagina-C (Moura-da-Silva *et.al.*, 2003).

Metaloproteinases de veneno de serpentes compreendem uma série de enzimas zinco-dependentes que apresentam massa molecular variável e são responsáveis pelos efeitos hemorrágicos provocados pelo envenenamento por serpentes Viperidae e Crotalidae (Bjarnason e Fox, 1994; Kamiguti *et.al.*, 1996 e 1998). Elas estão presentes em alta concentração no veneno de Viperidae e em menor proporção em serpentes da família Elapidae (Matsui *et.al.*, 2000).

Na literatura, tem sido relatada a capacidade de alguns componentes do veneno de serpentes, pertencente ao grupo de metaloproteinase, de inibir a migração celular *in vitro*, a adesão, proliferação e progressão tumoral *in vivo*. Por exemplo, proteínas apoptóticas de indução vascular 1 e 2 (VAP1 e VAP2), encontradas no veneno da cascavel western Diamondback (*Crotalus atrox*), são capazes de induzir morte apoptótica *in vitro*, mediada pelas integrinas  $\alpha 3\beta 1$  e  $\alpha 6\beta 1$  (Masuda *et.al.*, 1998). Crovidisina, uma metaloproteinase PIII purificada a partir de veneno da cascavel ocidental (*Crotalus viridis*) promove a proteólise de proteínas da matriz extracelular presentes em osteossarcoma (Tang *et.al.*, 2004).

Assim, metaloproteinases podem inibir o crescimento de tumor, gerando fragmentos proteolíticos que podem interagir com receptores transmembrânicos, como integrinas e proteínas de adesão que são superexpressos em células tumorais e em células endoteliais vasculares.

Entretanto, além das metaloproteinases, outras proteínas podem sofrer alterações com relação a citotoxicidade devido à temperatura. Patel *et. al.*(1969), ao investigarem as propriedades antitumorais do veneno de *Naja naja* observaram que a fração (citotoxina) isolada deste veneno atuou sobre as células tumorais de sarcoma de Yoshida levando a hiperplasia celular para quase o dobro do seu volume original, seguido por encolhimento que foi acompanhado por uma liberação de RNA e proteínas citoplasmáticas e destruição de células tumorais. Os autores também relataram que a destruição das células tumorais foi influenciada pela concentração de íons sódio ( $\text{Na}^+$ ), potássio ( $\text{K}^+$ ), magnésio ( $\text{Mg}^{2+}$ ) e cálcio ( $\text{Ca}^{2+}$ ), temperatura e pH.

As proteínas presentes nas frações citotóxicas não foram totalmente isoladas. Portanto, outras proteínas além das metaloproteinases, poderiam ter influenciado na citotoxicidade. Dentre as mais conhecidas e estudadas estão as disintegrinas, encontradas em diversos venenos ofídicos e que apresentam efeito citotóxico, sendo consideradas potentes inibidores da agregação plaquetária. Dados mostram que as disintegrinas inibem a adesão de células tumorais à matriz extracelular em células de murino B16 (Kang *et.al.*, 2000).

Yeh *et al.* (2001) mostraram que a rhodostomina em baixas concentrações não afetou a viabilidade de células tumorais B16F10. Entretanto,

esta disintegrina foi capaz de inibir a migração e invasão de HUVECs mediados por receptores FGF.

A saxatilina é uma disintegrina monomérica, contendo a sequência tripeptídica Arg-Gly-Asp, um típico motivo de adesão celular para a glicoproteína IIb-IIIa de plaquetas e integrinas  $\alpha\beta 3$  de células endoteliais (Hong *et.al.*, 2002). Além de inibir a agregação plaquetária, a saxatilina é responsável pela inibição de angiogênese e metástase de melanoma em linhagens modelo de camundongos (Kim *et.al.*, 2006).

O veneno de *Crotalus vegrandis* apresenta coloração amarelada, o que indica a presença de L-aminoácido-oxidases (LAAO), que representam geralmente por volta de 30% do veneno bruto de serpentes, sendo citotóxico em várias linhagens de células tumorais. Esta citotoxicidade é atribuída a formação  $H_2O_2$ , que é citotóxico (Suhr *et.al.*, 1999).

Naumann *et.al.*, em 2011, observou que a BI-LAAO, uma glicoproteína de 60 kDa encontrada na serpente *Bothrops leucurus* apresentava citotoxicidade em linhagens de células de câncer do estômago MKN-45, adeno carcinoma HUTU, coloretal RKO e fibroblasto humano LL-24. A liberação de peróxido de hidrogênio no meio de cultura, induziu o processo apoptótico nas células de maneira dose e tempo dependente, sendo este efeito inibido pela catalase.

Estas proteínas são estáveis a temperaturas entre 0 a 58°C (Baby *et.al.*, 2011), não sendo possivelmente então as prováveis responsáveis pelo efeito citotóxico observado nas frações do veneno.

Somente os picos citotóxicos foram submetidos à segunda etapa de purificação, em coluna de gel filtração, visando à separação das proteínas pela diferença de massa molecular. No total, oito picos foram coletados, enumerados conforme a primeira e a segunda purificação, VI-I, VI-II, VII-I, VII-II, VII-III, VIII-I, VIII-II e VIII-III, onde somente os picos VI-I e VII-II apresentaram redução da viabilidade celular, sendo a concentração das amostras de 0,33 mg/mL e 0,40 mg/mL, respectivamente. Porém, outras frações onde a concentração proteica era mais elevada como VI-II (0,48 mg/mL) e VII-III (0,38 mg/mL), não apresentaram citotoxicidade.

No último ensaio de viabilidade celular, foram usadas concentrações padrão de toxinas (200 µg/ml) para a linhagem L929 e células B16F10, com o objetivo de realizar uma avaliação comparativa dos efeitos citotóxicos. Pela análise da figura 12, observou-se maior sensibilidade das células de melanoma nos picos VI-II e VIII-II.

Estudos mostram que há uma expressão distinta de integrinas entre células tumorais e células normais. A maior sensibilidade da linhagem tumoral poderia ser explicada por uma expressão diferencial de uma integrina ausente na linhagem controle ou ainda por uma maior expressão destas moléculas na célula de melanoma, tornando esta mais susceptível à ação da toxina.

Ray e colaboradores (1999), mostraram que as células B16F10 expressam altos níveis de integrinas  $\alpha 1, \alpha 4, \alpha 5$  e  $\alpha 6$  além de  $\beta 1$  porém não expressam  $\alpha 2$  e  $\alpha 3$ . Os domínios tipo disintegrina das metaloproteinase tipo PIII, podem apresentar sequências alternativas ao motivo RGD, como o DCD ou ECD (Souza *et.al.*, 2000). Devido a sua alta afinidade e seletividade por integrinas, as disintegrinas são consideradas antagonistas de algumas moléculas de adesão (MacLane *et.al.*, 1998). Estudos recentes mostraram que as disintegrinas são também capazes de interagir com as células e ativar vias de sinalização mediadas por integrinas (Ritter *et.al.*, 2000). Disintegrinas que apresentam domínios RGD, assim como peptídeos ricos em cisteína podem ser considerados tanto como antagonistas ou agonistas de integrinas, dependendo do tipo celular (Coelho *et.al.*, 2004).

Além da análise da influência da concentração das toxinas frente a redução da viabilidade, é possível observar pelas fotomicrografias as alterações morfológicas provocadas após o tratamento com as frações coletadas a partir da coluna de exclusão molecular.

Yoshikura, *et.al.* em 1966, testaram a ação do veneno bruto de *Trimeresurus flavoviridis* e de duas proteínas hemorrágicas isoladas deste veneno: HR1 e HR2 em culturas de células HeLa, células pulmonares de camundongo e de fibroblastos humanos. Os autores observaram que tanto o veneno bruto quanto a proteína isolada HR2 provocavam alterações morfológicas nas linhagens celulares testadas, sem promover a morte celular. Após a remoção do veneno, as células cresceram normalmente de novo.

No ensaio imunoenzimático Western Blot (figura 15), utilizou-se como anticorpo primário o anti-jararagina. A jararagina, é uma metaloproteinase com domínio disintegrina, pertencente à classe PIII, com massa molecular de 46,7 kDa e 421 aminoácidos que apresenta sítio catalítico dependente de zinco ( $Zn^{+}$ ). No trabalho, foram observadas bandas reativas em praticamente todas as frações, com exceção das amostras referentes aos picos VIII-I e VIII-III. A maioria das toxinas de interesse apresentou imunoreatividade com um anticorpo policlonal contra esta metaloproteinase, sugerindo o envolvimento destas proteases no efeito citotóxico observado nas células tumorais murinas B16F10.

A identificação de metaloproteinase foi confirmado a partir da análise dos resultados obtidos por LC/MS/MS onde verificou-se a presença de sequências homólogas entre as metaloproteinase de *C.vegrandis* e a encontrada na espécie *C.durissus durissus*, confirmando assim os dados do Western Blot. A homologia de sequências, assim como a reatividade cruzada frente ao anticorpo anti-jararagina sugere proximidade evolutiva entre ambas as espécies.

Tanjon e colaboradores (2005) observaram que células endoteliais expostas à jararagina apresentaram uma redução de viabilidade celular acompanhada de perda de adesão e alterações no formato, desencadeados pelo processo de apoptose (Anoikis).

Ao submeter os picos citotóxicos à eletroforese em gel SDS PAGE 15%, (figura 10) foram observados a presença de bandas de aproximadamente 25 kDa, que supostamente assemelham-se em tamanho à crotocina, a principal neurotoxina isolada do veneno de *Crotalus durissus terrificus*, corroborando com os resultados de Kaiser e colaboradores (1987) que identificaram uma proteína crotocina símile no veneno de *C. vegrandis*, hipótese esta confirmada no ensaio de Western Blot (figura 16), onde utilizou-se como anticorpo primário soro anti-crotálico que reconheceu duas proteínas com massa molecular de aproximadamente 50 e 25 kDa. Além disso, observamos também bandas de baixo peso molecular nos picos VI-II e VII-III, sugerindo a presença de possíveis fosfolipases  $A_2$ .

A MVL-PLA<sub>2</sub>, originária do veneno de *Macrovipera lebetina transmediterranea* e pertencente ao grupo II de enzimas fosfolipase  $A_2$ , apresenta ação inibitória em algumas linhagens de células tumorais com perda de adesão

celular em concentrações acima de 2  $\mu\text{M}$ , tendo sido demonstrado que este efeito antitumoral foi mediado por  $\alpha 5\beta 1$  e algumas outras integrinas que possuem  $\alpha v$  (Bazaa *et.al.*, 2009).

Vários estudos têm mostrado que crotoxina apresenta atividade antitumoral *in vivo* e *in vitro* e interfere no crescimento tumoral modificando seletivamente os procesos celulares associados ao crescimento tumoral (Sampaio *et.al.*, 2010).

A citotoxicidade da crotoxina é inicialmente mediada pela interação de alta afinidade com receptores presentes na superfície da célula (Montecucco *et.al.*, 2008) e envolve a atividade da  $\text{PLA}_2$  (Corin *et.al.*, 1993).

Donato *et.al* em 1996, sugerem que os receptores transmembrânicos envolvidos na sinalização celular, por exemplo, o receptor de fator de crescimento epidermal (EGFr) são alvos celulares da atividade anti-proliferativa da crotoxina e esta atividade é dependente da fração básica ( $\text{PLA}_2$ ) da toxina.

A eficácia antitumoral mostrada *in vivo*, utilizando doses diárias de crotoxina, foi demonstrada em carcinoma pulmonar de Lewis com 83% de inibição do crescimento, e carcinoma mamário humano MX-1 que reduziu em 69% o crescimento das células. A baixa atividade observada em células leucêmicas HL-60, sugere que a crotoxina pode apresentar especificidade para tumores sólidos (Newman *et.al.*, 1993).

Cura e colaboradores (2002) administraram doses diárias de crotoxina durante 30 dias consecutivos em pacientes com diversos tipos de câncer como o de próstata, gastrointestinal, mama, cabeça e pescoço, dentre outros e observaram uma redução significativa no tamanho dos tumores.

Ao fracionarmos o veneno total em coluna de afinidade foi observada a presença de grande quantidade de metaloproteinases confirmada posteriormente pelos ensaios de Western Blot e zimografia das três frações coletadas (figuras 23 e 24). Isso mostra a riqueza de proteinases presentes neste veneno, que provavelmente seja uma das responsáveis pelo efeito hemorrágico encontrado nos acidentes ofídicos provocados pela *C. vegrandis*.

Ao realizar um ensaio comparativo entre os perfis cromatográficos das serpentes venezuelana e a brasileira (figura 26) observam-se semelhanças entre

os venenos. Este dado foi confirmado nos ensaios imunoenzimáticos Dot Blot (figura 27) e Western Blot (figura 28 e 29) onde houve o reconhecimento pelo anticorpo anti-crotálico de proteínas presentes em todas as frações coletadas, indicando epitopos em comum nos componentes dos dois venenos.

## 6. CONCLUSÃO

As toxinas do veneno total da *C. vegrandis* foram separadas em 12 frações por cromatografia de troca aniônica em sistema HPLC. O fracionamento mostrou-se eficaz frente ao efeito citotóxico, visto que o veneno total não se mostrou tóxico para as células tumorais.

As frações de interesse foram novamente separadas na segunda etapa cromatográfica em coluna de gel filtração, obtendo-se proteínas semi-purificadas. Tais proteínas apresentaram maior atividade citotóxica quando aplicadas em células B16F10.

O efeito citotóxico foi observado nas frações com baixas concentrações protéicas, comportamento comum encontrado em alguns venenos devido a adaptações encontradas nas serpentes para se proteger do efeito nocivo do próprio veneno.

Os dados obtidos nas análises por Western Blot, Dot Blot e SDS PAGE sugerem que esta atividade está relacionada à presença de principalmente metaloproteinase(s) e também de uma molécula crotoxina-símile. Esta metaloproteinase apresenta atividade autoproteolítica visto que, frações ativas submetidas a congelamento seguido de descongelamento mostraram menor atividade citotóxica, sugerindo labilidade da molécula ativa.

A análise por LC/MS/MS da fração ativa confirmou a presença de uma metaloproteinase da classe PIII, com homologia com uma toxina de *C. durissus durissus*.

Nos ensaios comparativos observamos significativa identidade imunológica entre os venenos da cascavel brasileira e a *Crotalus vegrandis*.

## 7. REFERÊNCIAS

AIRD, S.D., KAISER, I.I., LEWIS, R.V., KRUGGEL, W.G., A complete amino acid sequence for the basic subunit of crotoxin. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.249, p.296-300, 1986.

AKALU, A., CRETU, A., BROOKS, P.C., Targeting integrins for the control of tumour angiogenesis. **Expert Opinion on Investigational Drugs**.v.14, p.1475-1486, 2005.

AMARAL, C.F.S., REZENDE, N.A., DA SILVA, O.A., RIBEIRO, M. M. F., MAGALHAES, R. A., DOS REIS, R. J., CARNEIRO, J. G., CASTRO, J. R. S., Insuficiência renal aguda secundária a acidentes ofídicos, botrópico e crotálico. Análise de 63 casos. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 28: 220-227 1986.

ARAKI,S.,MASUDAB,S.,MAEDA,H.,YING,M.J.,HAYASHIA, H., Involvement of specific integrins in apoptosis induced by vascular apoptosis-inducing protein 1. **Toxicon**,v. 40,p.535-542,2002.

ARMMINGS, S.R., TRIPP, M.K., HERMANN, N.B., Approaches to the prevention and control of skin cancer. **Cancer Metastasis Review**, v.16, p.309-322, 1997.

BABY, J., SHEEJA, R., JEEVITHA, M.V., AJISHA, S.U.,Pharmacological effects of snake venom L-amino acid oxidases. **Internacional Journal of Research in Ayurveda & Pharmacy**, v.2, p.114-120, 2011.

BALDI, A., SANTINI, D., DE LUCCA, A., PAGGI, M.G., cDNA array technology in melanoma: an overview. **Journal of Cellular Physiology**, v.196, p. 219-223, 2003.

BAZAA, A., LUIS, J., SRAIRI-ABID, N., KALLECH-ZIRI, O., KESSENTINI-ZOUARI, R., DEFILLES, C., LISSITZKY, J., EL AYEB, M., MARRAKCHI, N., MVL-

PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biology**, v.28, p.188-193, 2009.

BERGFELD, W.F., The aging skin. **International Journal of Fertility and Women's Medicine**, v, 42, p.57-66, 1997.

BENNACEF-HEFFAR, N., LARABA-DJEBARI, F., Evaluation of the effect of gamma rays on the venom of *Vipera lebetina* by biochemical study. **Canadian Journal of Physiology and Pharmacology**, v.81, p.1110-1117, 2003.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W., Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Journal Toxicology. Toxins Review**. v.7, p.121-209, 1989.

BJARNASON, J.B., FOX J.W., Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacologic & Therapeutics**, v.62, p. 325–372.1994.

BJARNASON, J.B., FOX, J.W., Snake venom metalloendopeptidases: reprolysin. **Methods Enzymology**, v.248, p.345-368, 1995.

BRADFORD, M.M., A rapid sensitive method for quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **Analytical Biochemistry**, v.72, p.248-254, 1976.

BRASILEIRO FILHO, G., GUIMARÃES, R. C., BOGLIOLO, L., Distúrbios do crescimento e da diferenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. Bogliolo **Patologia**. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 6<sup>o</sup>ed. p. 149-193, 2000.

BRUSCHEK, S., IGNJATOVIC, V., SUMMERHAYES, R., LOWE, R., The effect of different snake venoms and anti-venoms on thrombin clotting time in human plasma. **Thrombosis Research**, v.125, p.149-152, 2010.

CALVETE, J.J., MORENO-MURCIANO, M.P., THEAKSTON, R.D., KISIEL,D.G., MARCINKIEWICZ, C.,Snake venom disintegrins: novel dimeric disintegrins and

structural diversification by disulphide bond engineering. **Biochemistry Journal**, v.372, p.725-734, 2003.

CHAIM-MATYAS, A., OVADIA, M., Cytotoxic activity of various snake venom on melanoma B16F10 and chondrosarcoma, **Life Sciences**, v.40, p.1601-1607, 1987.

CHEN, Q., MILLAR, H.J., MCCABE, F.L., MANNING, C.D., STEEVES, R., LAI, K., KELLOGG, B., LUTZ, R.J., TRIKHA, M., NAKADA, M.T., ANDERSON, G.M., *αv* Integrin-Targeted Immunoconjugates Regress Established Human Tumors in Xenograft Models. **Clinical Cancer Research**, v.13, p.3689-3695, 2007.

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., DE FREITAS, M., MARIANO-OLIVEIRA, A., RAPOZO, D.C.M., PINTO, R.F.L., NIEWIAROWSKI, S., ZINGALI, R.B., MARCINKIEWICZ, C., FIDALGO, C.B., RGD-MLD-disintegrins, jarastatin and EC3, activate integrin-mediated signaling modulating the human neutrophils chemotaxis, apoptosis and IL-8 gene expression. **Experimental Cell Research**, v.292, p.371-384, 2001.

CORIN, R. E., VISKATIS, L. J., VIDAL, J. C., ETCHEVERRY, M. A., Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. **Investigational New Drugs**, v.11, p.11-15, 1993.

CORRÊA JR, M.C., MARIA, D.A., MOURA DA SILVA, A. M., PIZZOCARO, K. F., RUIZ, I. R. G., Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, v.40, p.739-748, 2002.

COSTA, E.P., SANTOS, M.F., Jararhagin, a snake venom metalloproteinase-disintegrin, stimulates epithelial cell migration in an in vitro restitution model. **Toxicon**, v.44, p.861-870, 2004.

CURA, J.E., BLANZACO, D.P., BRISSON, C., CURA, M.A., CABROL, R., LARRATEGUY, L., MENDEZ, C., SECHI, J.C., SILVEIRA, J.S., THEILLER, E., DE

ROODT,A.R., VIDAL,J.C., Phase I and pharmacokinetics study of crotoxin (cytotoxic PLA(2), NSC-624244) in patients with advanced cancer.**Clinical Cancer Research**, v.8,p.1033-1041,2002.

CURY, I., PICOLO, G., KONNO, K., GIORGI, R., BRIGATTE, P., GUTIERREZ, V., CAMARGO, A., Analog compounds of analgesic peptides derived from the venom of *Crotalus durissus terrificus* snakes,their uses, compositions, methods of preparation and purification. **United States Patent Application Publication**, 2009.

CUSHMAN, D. W., ONDETTI, M. A., History of the design of captopril and related inhibitors of angiotensin converting enzyme. **Hypertension**, v.17, p.589-592, 1991.

DANEN,E.H.J., MARCINKIEWICZ, C., CORNELISSEN,I.M.H.A., VAN KRAATS, A.A., PACHTER, J.A., RUITER, D.J., NIEWIAROWSKI, S., VAN MUIJEN, G.N.P.,The Disintegrin Eristostatin Interferes with Integrin  $\alpha 4\beta 1$  Function and with Experimental Metastasis of Human Melanoma Cells **Experimental Cell Research**,v.238, p.188-196,1998.

DE VITA, HELLMAN and ROSENBERG`S, **Cancer: Principles & Practices of Oncology**.7°ed, p.7-13, 2005.

DELWEL, G.O., HOGERVORST, F., KUIKMAN, I., PAULSSON, M., TIMPL, R., SONNENBERG, A., Expression and function of the cytoplasmic variants of the integrin alpha 6 subunit in transfected K562 cells. Activation dependent adhesion and interaction with isoforms of laminin. **The Journal of Biological Chemistry**, v.268, p. 25865-25875, 1993.

DONATO, N.J., MARTIN, C.A., PEREZ, M., NEWMAN, R.A., VIDAL, J.C., ETCHEVERRY, M., Regulation of epidermal growth factor receptor activity by crotoxin, a snake venom phospholipase A2 toxin. A novel growth inhibitory mechanism. **Biochemical Pharmacology**, v. 51, 1535–1543, 1996.

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

EBLE, J.A., TUCKWELL, D.S., The  $\alpha 2\beta 1$  integrin inhibitor rhodocetin binds to the A-domain of the integrin  $\alpha 2$  subunit proximal to the collagen binding site. **Biochemistry Journal**, v.376, p.77–85, 2003.

EBLE, J.E., BRUCKNER, P., MAYER, U., Vipera lebetina venom contains two disintegrins inhibiting laminin-binding  $\beta 1$  integrins. **Journal of Biological Chemistry**, v. 278, p.26488–26496, 2003.

FAWCETT, J., HARRIS, A.L., Cell adhesion molecules and cancer. **Current Opinion Oncology**, v.4, p.142-148, 1992.

FRANCIS, B., SEEBART, C., KAISER, I.I., Citrate is an endogenous inhibitor of snake venom enzymes by metal-ion chelation. **Toxicon**, v.30, p.1239-1246, 1992.

FOROUHAR, F., HUANG, W. N., LIU, J.H., CHIEN, K.Y., WU, W.G., HSIAO, C.D., Structural basis of membrane-induced cardiotoxin A3 oligomerization. **Journal of Biological Chemistry**.v. 278, p. 21980-21988, 2003.

FOX, J.W., SERRANO, S.M., Exploring snake venom proteomes: multifaceted analysed for complex toxin mixtures. **Proteomics**, v.8, p.909-920, 2008.

FUJI, Y., OKUDA, D., FUJIMOTO, Z., HORII, K., MORITA, T., MIZUNO, H., Crystal structure of trimestatin, a disintegrin containing a cell adhesion recognition motif RGD. **Journal of Molecular Biology**, v.332, p. 1115-1122, 2003.

FUJIMURA, S., OSHIKAWA, K., TERADA, S., KIMOTO, E., Primary structure and autoproteolysis of brevilysin H6 from the venom of *Gloydius halys brevicaudus*. **The Journal of Biochemistry**, v.128, p.167-173, 2000.

GOEL, H.L., LANGUINI, L.R., Integrin signaling in cancer. **Cancer Treatment and Research** v.119, p.15-31, 2004.

GRAMS, F., HUBER, R., KRESS, L.F., MORODER, L., BODE, W., Activation of snake venom metalloproteinases by a cysteine switch-like mechanism. **FEBS Letters**, v.335, p.76-80, 1993.

GUBENSEK, F., TURK, V., DRUJAN, B., Proteolytic and clotting enzymes and some Venezuelan snake venoms. **Periodicum Biologorum**, v.80, p.101-109, 1978.

HAASS, N.K., SMALLEY, K.S.M., LI, L., HERLYN, M. Adhesion, migration and communication in melanocytes and melanoma. **Pigment Cell & Melanoma Research**, v.18, p.150-159, 2005.

HINTON, C. V., AVRAHAM, S., AVRAHAM, H. K., Contributions of Integrin-Linked Kinase to Breast Cancer Metastasis and Tumorigenesis. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v.12, p. 1517-1526, 2008.

HONG, S. Y., KOH, Y. S., CHUNG, K. H., KIM, D. S., Snake venom disintegrin, saxatilin, inhibits platelet aggregation, human umbilical vein endothelial cell proliferation, and smoothmuscle cell migration. **Thrombosis Research**, v.105, p. 79-86, 2002.

HONN, K.V., TANG, D.G., Adesion molecules and tumor cell interaction with endothelium and subendothelial matrix. **Cancer Metastasis Review**, v.11, p.353-375, 1992.

HOOPER, N.M., Families of zinc metalloproteases. **FEBS Letters**, v.354, p.1-6, 1994.

HUMPHRIES, J.D., BYRON, A., HUMPHRIES, M.J., Integrin ligands at a glance. **Journal of Cell Science**, v.119, p.3901-3903, 2006.

IWANAGA, S., SUSUKI, T., Enzymes in snake venom. In: **Handbook of Experimental Pharmacology**, v.52, p. 61-158, 1979.

JANES, S.M., WATT, F.M., New roles for integrins in squamous cell carcinoma. **Nature Reviews**, v.6, p.175-183, 2006.

JOHNSON, J.P., Cell adhesion molecules in the development and progression of malignant melanoma. **Cancer Metastasis Review**, v. 18, p. 345-357, 1999.

JOKHIO, R., ANSARI, A. F., Cobra Snake Venom reduces significantly tissue nucleic acid levels in Human Breast Cancer. **Journal of the Pakistan Medical Association**, v.55, p.55-71, 2005.

KAISER, I.I., AIRD, S.D., A crotoxin homolog from the venom of the Uracoan rattlesnake (*Crotalus vegrandis*). **Toxicon**, v.25, p.1113-1120, 1987.

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

KAMIGUTI, A.S., ZUZEL, M., THEAKSTON, R.D.G., Snake venom metalloproteinases and disintegrins: interactions with cells. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, v.31, p.853-862, 1998.

KANG, I., KIM, D.S., JANG, Y., CHUNG, K., Suppressive Mechanism of Salmosin, a Novel Disintegrin in B16 Melanoma Cell Metastasis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 275, p.169–173, 2000.

KIM, J., HONG, S., PARK, H., KIM, D., LEE, W., Structure and function of RGD peptides derived from disintegrin proteins. **Molecular Cells**, v.19, p.205–211, 2005.

KIM, K. S., KIM, D. S., CHUNG, K. H., PARK, Y.S., Inhibition of angiogenesis and tumor progression by hydrodynamic cotransfection of angiostatin K1-3, endostatin, and saxatillin genes. **Cancer Gene Therapy**, v. 13, p.563-571, 2006.

KOUYOUNDJIAN, J.A., HARRIS, J.B., JOHNSON, M.A., Muscle necrosis caused by the subunits of crotoxin. **Toxicon**, v. 24, p.575-583, 1986.

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

LAPA, M.S., GUEDES, K.F., SCHALCH, F.O., LANDMAN, G., Melanomas malignos cutâneos tratados no Hospital do Câncer de São Paulo: estudo retrospectivo para avaliação de distribuição, fatores prognósticos e sobrevida. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 77, p.313-20, 2002.

LEUNG, W.W., KEUNG, W.M., KONG, Y.C., The cytolytic effect of cobra cardiotoxin on Ehrlich ascites tumor cells and its inhibition by Ca<sup>2+</sup>. **Naun Schmied Archive Pharmacology**, v.292, p.193-198, 1976.

LI, W., XU, R.J., JIANG, L.H., SHI, J., LONG, X., FAN, B., Expression of cyclooxygenase-2 and inducible nitric oxide synthase correlates with tumor angiogenesis in endometrial carcinoma. **Medical Oncology**, v.22, p.63-70, 2005.

LIPPS, B.V., Selective cytolytic activity of snake venom proteins, atroporin and kaotree on various types of cancer cells. **World Congress on Animal, Plant and Microbial**, 11, Tel Aviv, 1994

LIPPS, B. V., Novel snake venom proteins cytolytic to cancer cell in vitro and in vivo systems. **Journal Venom Animal Toxins**. v.5, p.173-183, 1999.

MALICH,G.,MARKOVIC,B.,WINDER,C.,The sensitivity and specificity of the MTS tetrazolium assay for detecting the in vitro cytotoxicity of 20 chemicals using human cell lines. **Toxicology**, v.124, p.179-192, 1997.

MANGINI, J., LI, N., BHAWAN, J., Immunohistochemical markers of melanocytic lesions: a review of their diagnostic usefulness. **American Journal Dermatopathology**, v.24, p.270-281, 2002.

MARKLAND Jr, F.S., Antitumor action of crotalase, a defibrinogenating snake venom enzyme. **Seminars in Thrombosis and Hemostasis**, v.12, p.284-290, 1986.

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

MARQUES-PORTO, R., LEBRUN, I., PIMENTA, D.C., Self-proteolysis regulation in the *Bothrops jararaca* venom: The metallopeptidases and their intrinsic peptidic inhibitor. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v.147, p.424-433, 2008.

MARSH, N. A., Inventory of haemorrhagic factors from the snake venoms. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.71, p. 793-797, 1994.

MASUDA, S., HAYASHI, H., ARAKI, S., Two vascular apoptosis-inducing proteins from snake venom are members of the metalloprotease/disintegrin family. **European Journal Biochemistry**, v. 253, p.36-41, 1998.

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

MCLANE, M.A., MARCINKIEWICZ, C., VIJAY-KUMAR, S., WIERZBICKA-PATYNOWSKI, I., NIEWIAROWSKI, S., Viper venom disintegrins and related molecules. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.219, p.109-119, 1998.

MCLANE, M.A., KUCHAR, M.A., BRANDO, C., SANTOLI, D., PAQUETTE-STRAUB, C.A., MIELE, M.E., New Insights on Disintegrin-Receptor Interactions: Eristostatin and Melanoma Cells. **Haemostasis**, v.31, p.177-182, 2001.

MCLANE, M.A., SANCHÉZ, E.E., WONG, A., PAQUETTE-STRAUB, C., PÉREZ, J.C., Disintegrins. **Current Drug Targets Cardiovascular and Haematological Disorders**. v.4, p. 327–355, 2004.

MEIER, F., SATYAMOORTHY, K., NESBIT, M., HSU, M., SCHITTEK, B., GARBE, C., HERLYN, M., Molecular events in melanoma development and progression. **Frontiers in Bioscience**, 3ed, p.1005-1010, 1998.

MISEJEWSKI, G.J., Role of integrins in cancer: Survey of special patterns. **Proceedings of the Society for Experimental Biology and Medicine**, v.222, p.124-138, 1999.

MONTECUCCO, C., GUTIERREZ, J.M., LOMONTE, B., Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cellular and Molecular Life Science**, v.65, p. 2897-2912, 2008.

MONTEIRO, R.Q., ZINGALI, R.B., Bothrojacin, a proexosite I ligand, inhibits factor Va-accelerated prothrombin activation. **Journal of Thrombosis and Haemostasis**, v.87, p.288-293, 2002.

MOURA-DA-SILVA, A.M., DELLA-CASA, M. S., DAVID A. S., ASSAKURA A. M. T., BUTERA D., LEBRUN I. , SHANNON B. J. D., SERRANO S. M. T. , FOX J. W., Evidence of heterogeneous forms of the snake venom metalloproteinase jararhagin: a factor contributing to snake venom variability. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.409, p.395-401, 2003.

NAUMANN, G.B., SILVA, L.F., SILVA, L., FARIA, G., RICHARDSON, M., EVANGELISTA, K., KOHLHOFF, M., GONTIJO, C.M.F., NAVDAEV, A., de REZENDE, F.F., EBLE, J.A., SANCHEZ, E.F., Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1810, p.683-694, 2011.

NAWARAK, J., PHUTRAKUL, S., CHEN, S.T., Analysis of lectinbound glycoproteins in snake venom from the Elapidae and Viperidae families. **Journal of Proteome Research**, v.3, p. 383-392, 2004.

NATH, D., SLOCOMBE, P.M., WEBSTER, A., STEPHENS, P.E., DOCHERTY, A.J.P., MURPHY, G., Meltrin (ADAM-9) mediates cellular adhesion through  $\alpha 6\beta 1$  integrin, leading to a marked induction of fibroblast cell motility. **Journal of Cell Science**, v.113, p.2319-2328, 2000.

NEWMAN, R.A, VIDAL, J.C, VISKATIS, L.J, JOHNSON, J.I, ETCHEVERRY, M.A., VRCTC-310 – a novel compound of purified animal toxins separates antitumor efficacy from neurotoxicity. **Investigational New Drugs**, v.11, p.151-159, 1993.

NISHIJIMA, C.M., RODRIGUES, C.M., SILVA, M.A., LOPES-FERREIRA, M., VILEGAS, W., HIRUMA-LIMA, C.A., Anti-hemorrhagic Activity of Four Brazilian Vegetable Species Against Bothrops jararaca venom. **Molecules**, v.14, p.1072-1080, 2009.

OLFA, K., JOSE, L., SALMA, D., AMINE, B., NAJET, S.A., NICOLAS, A., MAZIME, L., RAOUDHA, Z., KAMEL, M., JACQUES, M., JEAN-MARC, S., MOHAMED, E.A., NAZIHA, M., Lebestatin, a disintegrin from Macrovipera venom, inhibits integrin-mediated cell adhesion, migration and angiogenesis. **Laboratory Investigations**, v. 85, p.1507-1516, 2005.

OWNBY, C.L., CAMERON, D., JU, A.T., Isolation of mytotoxic component from rattlesnake (*Crotalus viridis viridis*) venom. Electron microscopic analysis of muscle damage. **The American Journal of Pathology**, v.85, p.149-166, 1976.

OWNBY, C. L., SELISTRE, H.S.A., WHITE, S.P., FLETCHER, J.E., Lysine-49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, v.37, p. 411-445, 1999.

PARK, M.H., SON, D.J., KWAK, D.H., SONG, H.S., OH, K.W., YOO, H.S., LEE, Y.M., SONG, M.J., HONG, J.T., Snake Venom Toxin Inhibits Cell Growth through Induction of Apoptosis in Neuroblastoma Cells. **Archives of Pharmacal Research**, v.32, p.1545-1554, 2009.

PATEL, T.A., BRAGANÇA, B.M., BELLARE, R.A., Changes produced by cobra venom cytotoxin on the morphology of Yoshida sarcoma. **Experimental Cell Research**, v.57, p.289-297, 1969.

PLANTEFABER, L.C., HYNES, R.O., Changes in integrin receptor on oncogenically transformed cells. **The Cell**, v.56, p.281-290, 1989.

PULIDO-MENDEZ, M., RODRIGUEZ-ACOSTA, A., FINOL, H., AGUILAR, I., GIRÓN, M., E., **Journal of Submicroscopic Cytology and Pathology**, v.31, p.555-561, 1999.

RÁDIS-BAPTISTA, G., **Journal Venom Animal Toxins**, v.11, p.217-241, 2005.

RANG, H.P., DALE, M.M., RITTER, J.M., MOORE, P.K., **Farmacologia**, 5<sup>a</sup> ed. cap 32, p. 527-540, 2004.

RAY, S., CHATTOPADHYAY, N., BISWAS, N., CHATTERJEE A., Regulatory molecules in tumor metastasis. **Journal Environment Pathology Toxicology and Oncology**, v.18, p.251-259, 1999.

RHODES, A., R., Public education and cancer of the skin. What the people need to know about melanoma end non-melanoma skin cancer? **Cancer**, v.75, p. 613-36, 1995.

RITTER, M.R., ZHOU, Q., MARKLAND, F.S., Contortrostatin, a snake venom disintegrin, induces alphavbeta3-mediated tyrosine phosphorylation of CAS and FAK in tumor cells. **Journal Cell Biochemistry**, v.79, p.28-37, 2000.

RODRÍGUEZ-ACOSTA, A., MONDOLFI, A., ORIHUELA, R., ¿Qué hacer frente a un accidente ofídico? Caracas, Venediciones C.A. p. 1-108, 1995.

RODRIGUEZ-ACOSTA, A.R., AGUILAR, I., GIRON, M., PULIDO, V.R., Haemorrhagic Activity of Neotropical Rattlesnake (*Crotalus vegrandis* Klauber, 1941). **Venom Natural Toxins**, v.6, p.15-18, 1998.

ROSEMBERG, C., MAYER, J.Á., ECKHART, L., Skin cancer education; A national survey of YMCAs. **Journal Community Health**, v.22, p.373-385, 1997.

RUDD, C. L., VISKATIS, L. J., VIDAL, J. C., ETCHEVERRY, M. A., In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin in three human tumorcell lines and a normal human keratinocyte cell line. **Investigational New Drugs**, v.12, p.183-184, 1994.

RUOSLAHTI, E., RGD and other recognition sequences for integrins. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v.12, p.697–715, 1996.

SALANOVA, M., STEFANINI, M., DE, I. C., PALOMBI, F., Integrin receptor alpha 6 beta 1 is localized at specific sites of cell- to-cell contact in rat seminiferous epithelium. **Biology of Reproduction**, v.52,p. 79-87,1995.

SAMPAIO, S.C., HYSLOP, S., FONTES ,M.R.M., PRADO-FRANCESCHI, J., ZAMBELLI, V.O., MAGRO, A.J., BRIGATTE, P., GUTIERREZ, V.P., CURY,Y., Crotoxin: Novel activities for a classic b-neurotoxin. **Toxicon**, v.55, p.1045-1060, 2010.

SANTOS, M. M. V., SANT'ANA, C. D., GIGLIO, J. R., DA SILVA, R. J., SAMPAIO, S., SOARES, A. M.,FECCHIO, D., Antitumoural Effect of an L-Amino Acid Oxidase Isolated from Bothrops jararaca Snake Venom. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v.102, p.533-542, 2008.

SCANNONE, H., GRILLO, O., LANCINI, A., Enzymatic activities and other characteristics of Crotalus vegrandis snake venom. In: Rosenberg P, ed. **Toxins: Animal, Plant and Microbial**, p. 223-229, 1978.

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

SHIMOKAWA, K., SHANNON, J.D., JIA, L.G., Sequence and Biological Activity of Catrocollastatin-C: A Disintegrin-Like/Cysteine-Rich Two-Domain Protein from Crotalus atrox Venom **Archives of Biochemistry**, v.343, p.35-43, 1997.

SHIMOKAWA, K., JIA, L.G., WANG, X.M., FOX, J.W., Expression, activation, and processing of the recombinant snake venom metalloproteinase, proatrolysin E. **Archives of Biochemistry and Biophysics**,v. 335,p. 283–294,1996.

SIIGUR, E., SAMEL, M., TONISMAGI, K., SUBBI, J., REINTAMM, T., SIIGUR, J., Isolation, properties and N-terminal amino acid sequence of a factor V activator from *Vipera lebetina* (Levantine viper) snake venom. **Biochimica et Biophysica Acta**, v.1429, p.239-248, 1998.

SLOTBOOM, A. J., VERHEIJ, H. M., DEHAAS, G. H., On the mechanism of phospholipase A2. **Phospholipids**, v. 4, p. 359-434, 1982.

STOCKER, K.F., **Medical of Snake Venom Proteins**.CRC press, p.34-50, 1990.

SOUZA, D.H., IEMMA, M.R., FERREIRA, L.L., FARIA, J.P., OLIVA, M.L.V., ZINGALI, R.B., NIEWIAROWSKI, S., SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S., The disintegrin-like domain of the snake venom metalloprotease alternagin inhibits alpha2beta1 integrin mediated cell adhesion **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v.384, p.341-350, 2000.

SUHR, S.M., KIM, D.S., Comparison of the apoptotic pathways induced by L-aminoacid oxidase and hydrogen peroxide. **Journal of Biochemistry (Tokyo)**, v.125, p.305-309, 1999.

TANG, C.H., YANG, R.S., LIU, C.Z., HUANG, T.F., FU, W.M., Differential susceptibility of osteosarcoma cells and primary osteoblasts to cell detachment caused by snake venom metalloproteinase protein. **Toxicon**, v. 43, p.11-2, 2004.

TANJONI, I., WEINLICH, R., DELLA-CASA, M.S., CLISSA, P.B., SALDANHA GAMA, R.F., de FREITAS, M.S., BARJA-FIDALGO, I., AMARANTE-MENDES G.P., MOURA-da-SILVA, A.M., Jararhagin, a snake venom metalloproteinase, induces a specialized form of apoptosis (anoikis) selective to endothelial cells. **Apoptosis**, v.10, p.851-861, 2005.

TERADA, S., HORI, J., FUJIMURA, S., KIMOTO, E., Purification and Amino Acid Sequence of Brevilysin L6, a Non-Hemorrhagic Metalloprotease from *Agkistrodon halys brevicaudus* Venom. **The Journal of Biochemistry**, v.25, p. 64-69, 1999.

THOMPSON, A., BRENNAN, K., COX, A., GEE, J., HARCOURT, D., HARRIS, A., HARVIE, M., HOLEN, I., HOWELL, A., NICHOLSON, R., STEEL, M., STREULI, C., Evaluation of the current knowledge limitations in breast cancer research - a gap analysis. **Breast Cancer Research**, v.10, p.1-25, 2008.

TRIKHA, M., DE CLERCK, Y.A., MARKLAND, F.S., Metastatic Melanoma Cell Adhesion and Blocks Experimental Metastasis. **Cancer Research**, v.54, p.4993-4998, 1994.

TSETLIN, V.I., HUCHO, F., Snake and snail toxins acting on nicotinic acetylcholine receptors: fundamental aspects and medical applications. **FEBES Letters**.v. 557, p. 9-13, 2004.

VERHEIJ, H.M., BOFFA, M.C., ROTHEN, C., BRICKAERT, M., VERGER, R., HAASS, G.H., Correlation of Enzymatic Activity and Anticoagulant Properties of Phospholipase A2. **European Journal Biochemistry** v.112, p. 25-32, 1980.

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

YAMADA, D., SHINA, Y., MORITA T., Nucleotide sequence of a cDNA encoding a common precursor of disintegrin flavostatin and hemorrhagic factor HR2a from the venom of *Trimeresurus flavoviridis*. **FEBES Letters**, v.451, p. 299-302, 1999.

YOSHIKURA, H., OGAWA, H., OHSAKA, A., OMORI-SATOH, T., Action of *Trimeresurus flavoviridis* venom and partially purified hemorrhagic principles on animal cells cultivated *in vitro*. **Toxicon**, v.4, p.183-190,1966.

YEH,C., PENG,H., YANG,R., HUANG, T.,Rhodostomin, A Snake Venom Disintegrin, Inhibits Angiogenesis Elicited by Basic Fibroblast Growth Factor and Suppresses Tumor Growth by A Selective avb3 Blockade of Endothelial Cells. **Molecular Pharmacology**, v.59, p. 1333-1342, 2001.