

**Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares
AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO**

**COMPONENTES DERIVADOS DE VENENOS DE SERPENTES COM AÇÃO
ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO**

RODRIGO GUIMARÃES QUEIROZ

**Tese apresentada como parte dos
requisitos para obtenção do Grau de
Doutor em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear – Aplicações**

**Orientadora:
Profa. Dra. Nanci do Nascimento**

**São Paulo
2012**

COMPONENTES DERIVADOS DE VENENOS DE SERPENTES COM AÇÃO ANTITUMORAL EM CÉLULAS DE MELANOMA MURINO

Rodrigo Guimarães Queiroz

RESUMO

Apesar dos constantes avanços no tratamento de câncer, essa doença continua sendo uma das principais causas de mortalidade no mundo todo, portanto, é imperativo que novas modalidades de tratamento sejam desenvolvidas. Venenos de serpentes causam uma variedade de efeitos biológicos, pois constituem uma mistura complexa de substâncias como disintegrinas, proteases (serino e metalo), fosfolipases A_2 , L-aminoácido oxidases entre outras. No presente trabalho pesquisou-se em alguns venenos de serpentes frações com atividade antitumoral, pois há relatos de compostos ofídicos que apresentam esta atividade. Após fracionamento de venenos de serpentes das famílias *Viperidae* e *Elapidae* foram feitas incubações das frações obtidas com células normais de fibroblasto L929 e de melanoma B16-F10. Os resultados mostraram que as frações do veneno da serpente *Notechis ater niger* apresentaram a maior especificidade e potencial antitumoral em células de melanoma murino B16-F10 que os demais venenos utilizados. Este achado, aliado ao fato de ser um veneno pouco explorado foram determinantes para que este veneno fosse selecionado para dar continuidade aos estudos. As frações citotóxicas deste veneno foram submetidas a análises para identificar e caracterizar os componentes que apresentaram esta atividade antitumoral. Ensaios de western-blot e zimografia sugerem que estas proteínas não pertencem à classe das metalo e serinoproteinases.

SNAKE VENOMS COMPONENTS WITH ANTITUMOR ACTIVITY IN MURINE MELANOMA CELLS

Rodrigo Guimarães Queiroz

ABSTRACT

Despite the constant advances in the treatment of cancer, this disease remains one of the main causes of mortality worldwide. So, the development of new treatment modalities is imperative. Snake venom causes a variety of biological effects because they constitute a complex mixture of substances as disintegrins, proteases (serine and metallo), phospholipases A2, L-amino acid oxidases and others. The goal of the present work is to evaluate the anti-tumor activity of some snake venoms fractions. There are several studies of components derived from snake venoms with this kind of activity. After fractionation of snake venoms of the families *Viperidae* and *Elapidae*, the fractions were assayed towards murine melanoma cell line B16-F10 and fibroblasts L929. The results showed that the fractions of venom of the snake *Notechis ater niger* had higher specificity and potential antitumor activity on B16-F10 cell line than the other studied venoms. Since the components of this venom are not explored yet coupled with the potential activity showed in this work, we decided to choose this venom to develop further studies. The cytotoxic fractions were evaluated to identify and characterize the components that showed antitumoral activity. Western blot assays and zymography suggests that these proteins do not belong to the class of metallo and serine proteinases.

*Este trabalho é dedicado à minha família na qual eu sempre pude
confiar e nunca me abandonou.
Amo muito vocês.*

Agradecimentos

Agradeço a Deus por simplesmente permitir que eu experimentasse o dom da vida.

A toda minha família: meu pai Oswaldo Queiroz Jr., minha mãe Ana Maria V.G. Queiroz, meu irmão Adriano G. Queiroz.

Agradeço a minha noiva Cristiane por todo apoio, suporte, conversas, companheirismo e por me completar.

Agradeço eternamente à minha amiga Elaine Provatti por tudo que nós já passamos e principalmente por ter me apresentado sua irmã.

A minha querida orientadora Nanci do Nascimento pelo apoio e confiança.

Ao meu mestre e co-orientador Patrick Jack Spencer por toda a paciência e ensinamentos.

À Dra. Ruth Vassão do Instituto Butantan pela ajuda e ensinamentos em cultivo celular.

Ao Dr. Daniel Carvalho Pimenta do Instituto Butantan pelo suporte, colaboração e conselhos no adamento do trabalho.

Ao Dr. Daniel Perez Vieira pelas dicas fornecidas em cultivo celular.

Ao Dr João Ezequiel de Oliveira (Johnny) pela ajuda nas purificações e fornecimento de reagentes.

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

Aos companheiros de laboratório Ana Elena, Natália, Laura, Daniela e Rosa pelo apoio e momentos de risadas.

Ao Dr. Peter Mirtschin da Venom Supplies pelo fornecimento dos venenos.

Aos funcionários do IPEN, Sr Longino, Bete, Arlete e Ruth pela manutenção e organização dos laboratórios.

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

Ao meu amigo e colega de trabalho Vincent Louis Viala pelos conselhos e apoio em todos os experimentos e por se demonstrar sempre solícito.

À minha amiga e também colega de bancada Karina Corleto de Oliveira por toda ajuda desde a disciplina de efeitos biológicos.

À minha irmãzinha Tamara Mico Fucase pelas risadas, conselhos e por ter entrado na minha vida.

Ao IPEN pela infraestrutura necessária.

À CAPES pelo financiamento do projeto

“A mente que se abre a uma nova idéia jamais voltará ao seu tamanho original.”

Albert Einstein

SUMÁRIO

	Páginas
1	INTRODUÇÃO 15
1.1	Câncer..... 15
1.2	Câncer de pele 18
1.3	Tratamento 20
1.4	Venenos ofídicos..... 22
1.5	Venenos de serpentes e Câncer 26
2	OBJETIVOS 29
2.1	Objetivos específicos 29
3	MATERIAL E MÉTODOS 30
3.1	Venenos ofídicos..... 30
3.2	Cromatografia líquida de troca iônica..... 30
3.3	Dosagem de Proteína 31
3.4	Concentração das frações por meio de centrifugação 31
3.5	Cromatografia líquida de exclusão molecular 31
3.6	Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)..... 32
3.7	Zimografia 32
3.8	Western Blot..... 33
3.9	Cultura de fibroblastos 33
3.10	Cultura de células tumorais..... 33
3.11	Ensaio de citotoxicidade (MTS)..... 34
3.12	Cálculos e análise estatística 34
4	RESULTADOS 35
4.1	Veneno da serpente <i>Acanthophis antarcticus</i> 35
4.1.1	Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de <i>Acanthophis antarcticus</i> 35

4.1.2	Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de <i>Acanthophis antarcticus</i>	37
4.1.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente <i>Acanthophis antarcticus</i>	38
4.1.4	Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente <i>Acanthophis antarcticus</i>	39
4.1.5	Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente <i>Acanthophis antarcticus</i>	39
4.2	Veneno da serpente <i>Agkistrodon bilineatus</i>	40
4.2.1	Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de <i>Agkistrodon bilineatus</i>	40
4.2.2	Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de <i>Agkistrodon bilineatus</i>	41
4.2.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente <i>Agkistrodon bilineatus</i>	42
4.2.4	Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente <i>Agkistrodon bilineatus</i>	42
4.2.5	Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente <i>Agkistrodon bilineatus</i>	43
4.3	Veneno da serpente <i>Notechis scutatus scutatus</i>	44
4.3.1	Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de <i>Notechis scutatus scutatus</i>	44
4.3.2	Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de <i>Notechis scutatus scutatus</i>	46
4.3.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente <i>Notechis scutatus scutatus</i>	47
4.3.4	Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente <i>Notechis scutatus scutatus</i>	48
4.3.5	Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente <i>Notechis scutatus scutatus</i>	49
4.4	Veneno da serpente <i>Pseudonaja textilis</i>	50
4.4.1	Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de <i>Pseudonaja textilis</i>	50

4.4.2	Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de <i>Pseudonaja textilis</i>	51
4.4.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente <i>Pseudonaja textilis</i>	52
4.4.4	Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente <i>Pseudonaja textilis</i>	53
4.5	Veneno da serpente <i>Notechis ater niger</i>	54
4.5.1	Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	54
4.5.2	Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	55
4.5.3	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente <i>Notechis ater niger</i>	56
4.5.4	Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente <i>Notechis ater niger</i>	57
4.5.5	Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente <i>Notechis ater niger</i>	58
4.6	Resultados das frações citotóxicas do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	59
4.6.1	Western-Blot.....	59
4.6.2	Zimografia	60
4.7	Fracionamento das frações III, IV, V E VI por cromatografia de exclusão molecular e subsequente eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)	61
4.7.1	Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração III obtida do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	61
4.7.2	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração III do veneno de <i>Notechis ater niger</i> obtida após fracionamento de exclusão molecular.....	62
4.7.3	Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração IV obtida do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	63
4.7.4	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração IV do veneno de <i>Notechis ater niger</i> obtida após fracionamento de exclusão molecular.....	64

4.7.5	Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração V obtida do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	65
4.7.6	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração V do veneno de <i>Notechis ater niger</i> obtida após fracionamento de exclusão molecular.....	66
4.7.7	Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração VI do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	67
4.7.8	Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração VI do veneno de <i>Notechis ater niger</i> obtida após fracionamento de exclusão molecular.....	68
5	DISCUSSÃO	69
6	CONCLUSÃO	80
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	81

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 -	Perfil cromatográfico (corrida analítica) do veneno total da serpente de <i>Acanthophis antarcticus</i> em coluna de troca aniônica.....	35
Figura 2 -	Perfil cromatográfico (corrida preparativa) do veneno total da serpente de <i>Acanthophis antarcticus</i> em coluna de troca aniônica.....	37
Figura 3 -	SDS PAGE a 13% das frações de <i>Acanthophis antarcticus</i> obtidas na troca aniônica	38
Figura 4 -	Citotoxicidade em células L929 e B16-F10 das frações de <i>Acanthophis antarcticus</i> derivadas da troca aniônica	39
Figura 5 -	Perfil cromatográfico (corrida analítica) do veneno total da serpente de <i>Agkistrodon bilineatus</i> em coluna de troca aniônica	40
Figura 6 -	Perfil cromatográfico (corrida preparativa) do veneno total da serpente de <i>Agkistrodon bilineatus</i> em coluna de troca aniônica	41
Figura 7 -	SDS PAGE a 13% das frações de <i>Agkistrodon bilineatus</i> obtidas na troca aniônica	42
Figura 8 -	Citotoxicidade em células L929 e B16-F10 das frações de <i>Agkistrodon bilineatus</i> derivadas da troca aniônica	43
Figura 9 -	Perfil cromatográfico (corrida analítica) do veneno total da serpente de <i>Notechis scutatus scutatus</i> em coluna de troca aniônica.....	44
Figura 10 -	Perfil cromatográfico (corrida preparativa) do veneno total da serpente de <i>Notechis scutatus scutatus</i> em coluna de troca aniônica.....	46
Figura 11 -	SDS PAGE a 12% das frações de <i>Notechis scutatus scutatus</i> obtidas na troca aniônica	47
Figura 12 -	Citotoxicidade em células L929 e B16-F10 das frações de <i>Notechis scutatus scutatus</i> derivadas da troca aniônica.....	49

Figura 13 - Perfil cromatográfico (corrida analítica) do veneno total da serpente de <i>Pseudonaja textilis</i> em coluna de troca aniônica.....	50
Figura 14 - Perfil cromatográfico (corrida preparativa) do veneno total da serpente de <i>Pseudonaja textilis</i> em coluna de troca aniônica.....	51
Figura 15 - SDS PAGE a 15% das frações de <i>Pseudonaja textilis</i> obtidas na troca aniônica.....	52
Figura 16 - Citotoxicidade em células B16-F10 das frações de <i>Pseudonaja textilis</i> derivadas da troca aniônica	53
Figura 17 - Perfil cromatográfico (corrida analítica) do veneno total da serpente de <i>Notechis ater niger</i> em coluna de troca aniônica	54
Figura 18 - Perfil cromatográfico (corrida preparativa) do veneno total da serpente de <i>Notechis ater niger</i> em coluna de troca aniônica	55
Figura 19 - SDS PAGE a 13% das frações de <i>Notechis ater niger</i> obtidas na troca aniônica.....	56
Figura 20 - Citotoxicidade em células L929 e B16-F10 das frações de <i>Notechis ater niger</i> derivadas da troca aniônica	58
Figura 21 - WESTERN-BLOT das frações citotóxicas III, IV, V, VI derivadas do fracionamento de troca aniônica do veneno da serpente <i>Notechis ater niger</i>	59
Figura 22 - Zimografia das frações citotóxicas III, IV, V, VI derivadas do fracionamento de troca aniônica do veneno da serpente <i>Notechis ater niger</i>	60
Figura 23 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular realizada na Fração III obtida em coluna de troca aniônica	61
Figura 24 - SDS-PAGE a 12,5% realizado na Fração III obtida em coluna de troca aniônica.....	62
Figura 25 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular realizada na Fração IV obtida em coluna de troca aniônica	63
Figura 26 - SDS-PAGE a 12,5% realizado na Fração IV obtida em coluna de troca aniônica.....	64
Figura 27 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular realizada na Fração V obtida em coluna de troca aniônica	65

Figura 28 - SDS-PAGE a 12,5% realizado na Fração V obtida em coluna de troca aniônica.....	66
Figura 29 - Perfil da cromatografia de exclusão molecular realizada na Fração VI obtida em coluna de troca aniônica.....	67
Figura 30 - SDS_PAGE a 12,5% realizado na Fração VI obtida em coluna de troca aniônica.....	68

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Nomenclatura científica e popular dos venenos selecionados.....	30
Tabela 2 -	Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica do veneno de <i>Acanthophis antarcticus</i>	36
Tabela 3 -	Concentração das amostras do veneno de <i>Acanthophis antarcticus</i> obtidas nas etapas de troca aniônica	39
Tabela 4 -	Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica do veneno de <i>Agkistrodon bilineatus</i>	40
Tabela 5 -	Concentração das amostras do veneno de <i>Agkistrodon bilineatus</i> obtidas nas etapas de troca aniônica.....	42
Tabela 6 -	Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica do veneno de <i>Notechis scutatus scutatus</i>	45
Tabela 7 -	Concentração das amostras do veneno de <i>Notechis scutatus scutatus</i> obtidas nas etapas de troca aniônica	48
Tabela 8 -	Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica do veneno de <i>Pseudonaja textilis</i>	50
Tabela 9 -	Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica do veneno de <i>Notechis ater niger</i>	54
Tabela 10 -	Concentração das amostras do veneno de <i>Notechis ater niger</i> obtidas nas etapas de troca aniônica.....	57

1. INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

O câncer é uma doença que atinge milhões de pessoas no mundo inteiro (Thompson *et al.*, 2008), cuja probabilidade de morte se torna maior quando o diagnóstico é feito tardiamente. Ele se origina a partir de uma neoplasia causada por mutações que ocorrem na molécula guardiã de todo o código genético de um indivíduo, o DNA. Para que o processo de carcinogênese ocorra é preciso haver um agente iniciador, que esteja associado a fatores endógenos ou exógenos como agentes químicos, físicos, genéticos ou ambientais.

Os processos biológicos que envolvem o desenvolvimento de uma neoplasia são diversos, como por exemplo, deleções ou adições de pares de base, translocações cromossômicas, formação de heterodímeros, oxidação gerada por radicais livres, ativação de proto-oncogenes e quebra de fita dupla. Como consequência destes processos, proteínas param de se expressar, ou são altamente expressas, podendo haver também a perda da atividade biológica de certas proteínas e/ou a ativação de receptores ou genes silenciados, proto-oncogenes, perda de heterozigose cromossômica e amplificação gênica.

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 pelas chamadas vias de reparo, que são acionadas quando 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, o segundo caminho é chamado de apoptose, que significa morte celular programada. O câncer, portanto, só ocorre quando as vias de reparo acionadas são insuficientes para

corrigir o dano e a apoptose não ocorre (de Miranda *et al.*, 2011, Moraes *et al.*, 2012).

A célula neoplásica pode permanecer latente até um agente promotor induzir o crescimento do tecido iniciado. Dentre os agentes promotores estão os hormônios, promotores de crescimento, promotores específicos e processo inflamatório (Franks e Teich, 1990).

Esses agentes promotores podem interferir no processo de diferenciação celular, que ocorre quando as células passam de população de células pluripotentes para células funcionantes (Ward, 2002).

O fator diferenciação é uma característica importante nas células tumorais, podendo ser observada desde a retenção da estrutura diferenciada normal sem alteração abrupta da função da célula original até uma desdiferenciação ou anaplasia que representa perda de quase todas as características normais do tecido que originou a célula (de Vita *et al.*, 2005; Axelson *et al.*, 2005).

O grau de desdiferenciação está relacionado à velocidade do crescimento tumoral, onde o menor grau (Grau I) corresponde a um crescimento mais lento da população de células tumorais, contudo essa relação não é uma regra isenta de erros, embora forneça uma direção para entender o comportamento tumoral (Bignold, 2007).

O crescimento celular anormal é o que basicamente distingue uma célula tumoral de uma célula normal, porém, o comportamento da célula tumoral no microambiente na qual ela se desenvolve pode ser diferente para cada tumor ou tecido do qual ele se origina. Para esse tipo de comportamento, podemos classificar os tumores em benignos, *in situ* e malignos (de Vita *et al.*, 2005).

Os tumores benignos podem se originar em qualquer tecido e não apresentam caráter invasivo, limitando-se ao local onde se originaram, podendo causar a obstrução ou pressão local devido ao volume da massa tumoral (Franks e Teich, 1990; Ward, 2002).

Tumores *in situ* são, em sua maioria, pequenos e se originam no epitélio, onde a morfologia de suas células se assemelha às células tumorais, entretanto, se restringem apenas à camada epitelial, sem caráter invasivo.

Os tumores malignos são aqueles nos quais as células tumorais já estão muito bem desenvolvidas. Esses tumores também apresentam uma alta capacidade de invasão e destruição dos tecidos adjacentes. Vale ressaltar que, a adesão celular que ocorre através da comunicação célula-célula e célula-matriz a partir de receptores de membrana específicos (por exemplo, integrinas) possui um papel fundamental contribuindo com a proliferação e sobrevivência de um tumor (Tucker, 2006).

As células tumorais também necessitam de nutrientes obtidos da corrente sanguínea para sobreviverem e proliferarem, e para que isso ocorra, elas produzem fatores de crescimento que estimulam o desenvolvimento de novos vasos (angiogênese) através do tumor, nutrindo-o (Ward, 2002; de Vita *et al.*, 2005).

Algumas células tumorais perdem suas propriedades adesivas e se desprendem do tumor podendo atravessar as paredes dos vasos sanguíneos ou serem absorvidas pelo sistema linfático. Uma vez que a célula tumoral entra na corrente sanguínea, ela está vulnerável ao ataque de uma série de mecanismos imunológicos de reconhecimento e eliminação, portanto, a célula tumoral deve embolizar e sobreviver para conseguir se estabelecer em outro microambiente. Assim, algumas células tumorais produzem fatores químicos que atraem plaquetas, as quais se aderem ao redor das células e as escondem do sistema imunológico (Jurasz *et al.*, 2004).

Adicionalmente, as plaquetas protegem as células tumorais de serem danificadas por forças de cisalhamento presentes na corrente sanguínea e fornecem um rico suprimento de fatores de crescimento (por exemplo, o fator de crescimento endotelial ou EGF) que ajudarão na sobrevivência da célula tumoral em circulação. Isso contribui para que a célula tumoral se desenvolva em outros órgãos gerando tumores secundários. Todo este processo é denominado metástase (Ward, 2002; Li *et al.*, 2002). A agressividade dos tumores malignos é proporcional à sua capacidade de se metastatizar (Franks e Teich, 1990).

Os diferentes tipos de câncer correspondem aos vários tipos de células do corpo. Por exemplo, existem diversos tipos de câncer de pele porque a pele é formada de mais de um tipo de célula. Se o câncer tem início em tecidos epiteliais como os da pele ou mucosas, ele é denominado carcinoma. Quando ele se

origina em tecidos conjuntivos como osso, músculo ou cartilagem é chamado de sarcoma. Outras características que diferenciam os diversos tipos de câncer entre si são a velocidade de multiplicação das células e a capacidade de invadir tecidos e órgãos vizinhos ou distantes (INCA, website, 2011).

1.2. Câncer de pele

A incidência de câncer de pele tem crescido durante as últimas décadas e é dividido em dois tipos: não melanoma e melanoma. O primeiro acomete aproximadamente 96% de todos os cânceres de pele. Aproximadamente 2 a 3 milhões de cânceres de pele não melanoma e 132.000 melanomas ocorrem por ano mundialmente, e um em cada três cânceres diagnosticados é de pele. Nos Estados Unidos, por exemplo, um em cada cinco americanos irá desenvolver câncer de pele durante a vida (OMS, website 2012; Skin Cancer Foundation website, 2012). Inúmeras são as causas que podem ser apontadas para esse aumento, como as mudanças dos hábitos de vida, a exposição solar excessiva, alterações na camada de ozônio e o envelhecimento da população (Rhodes, 1995; Rosenberg *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. 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; Rigel, 2008; Saladi *et al.*, 2009).

O câncer de pele não melanoma, no Brasil, corresponde a 25% de todas as malignâncias registradas no país, entretanto, entre os tumores de pele, este tipo de câncer, apesar de ter a maior incidência, é o que tem menor taxa de mortalidade. A estimativa para o câncer de pele, tipo não melanoma, para este ano de 2012 é de 134.170 novos casos entre homens e mulheres (INCA, website 2011).

Dentre os carcinomas de pele não melanoma, os que ocorrem com maior frequência são o carcinoma basocelular (CBC) e o carcinoma de célula escamosa ou espinocelular (CEC). A exposição aos raios ultravioleta é o principal fator de risco no desenvolvimento deste tipo de câncer, mas outros fatores de risco como vírus (neste caso, HPV) e genéticos também podem contribuir no processo de tumorigênese (Harwood *et al.*, 2000; Nindl *et al.*, 2007).

O câncer de pele melanoma tem sido uma das malignâncias que vem crescendo rapidamente nas últimas décadas, tanto que, durante os últimos 30 anos, o crescimento anual deste tipo de neoplasia é de 3%. É um tipo de câncer de pele de caráter invasivo, ou seja, uma alta capacidade de metastatização. Apesar de apenas representar aproximadamente 4% dos cânceres de pele, o melanoma cutâneo é responsável por 79% das mortes por câncer de pele (de Vita *et al.*, 2005). O prognóstico desse tipo de câncer pode ser considerado bom se detectado nos estágios iniciais. Para o ano de 2012, a estimativa para novos casos de melanoma cutâneo no Brasil é de 6.230 casos (Villares *et al.*, 2011; INCA, website 2011).

O Melanoma se origina de melanócitos produtores da pigmentação da pele. A pele humana tem sua derme e epiderme separadas por uma membrana basal e os melanócitos estão localizados nessa membrana. Os melanócitos, após a divisão celular, separam-se e migram ao longo da membrana basal. Eles estendem seus dendritos com o objetivo de estabelecer contato com os queratinócitos e, uma vez que a adesão celular dos melanócitos com os queratinócitos é estabelecida, os queratinócitos irão controlar o comportamento e o crescimento dos melanócitos, assim como a expressão de receptores de membrana celular (Haass e Herlyn, 2005). Esse controle ocorre por meio de um sistema complexo de fatores de crescimento parácrinos e moléculas de adesão célula-célula.

A desregulação desta homeostase pode perturbar o equilíbrio da unidade de melanina epidermal e desencadear a proliferação contínua dos melanócitos, o que pode levar ao desenvolvimento de um melanoma maligno (Haass *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de um melanoma não envolve apenas as mudanças genéticas e epigenéticas que ocorrem dentro da célula, mas também

envolve processos coletivamente determinados por fatores microambientais, incluindo interação e comunicação célula-célula. Dessa forma, moléculas de adesão celular exercem um papel fundamental nesses processos, e, durante a transformação de células normais em células altamente malignas, algumas destas moléculas de adesão param de se expressar, bem como outras moléculas de adesão começam a ser expressas (Li *et al.*, 2002).

Existem diversos tipos e estruturas de receptores transmembrânicos que contribuem com a manutenção da comunicação entre célula-célula e célula-matriz dos tumores (Li *et al.*, 2002). Entre os receptores estão as caderinas e as integrinas, que possuem uma participação importante na manutenção, proliferação, migração e sobrevivência dos melanomas (Seftor *et al.*, 1999).

Outro fator importante na metastatização e adaptação da célula de melanoma em locais distantes do tumor primário é a capacidade dessas células de se agregarem às plaquetas, ou seja, a indução de agregação plaquetária por células de melanoma auxiliam na sobrevivência das células na vasculatura. Adicionalmente, as plaquetas facilitam a adesão dessas células no endotélio vascular e liberam fatores de crescimento que contribuem para o crescimento do tumor em um novo local (Jurasz *et al.*, 2004).

Considerando esses fatores, é imperativa a busca de novas moléculas que possam interferir nos processos de adesão celular e agregação plaquetária ou causar morte celular ativando vias de apoptose, anoikis ou necrose (Tanjoni *et al.*, 2005).

1.2.1. Tratamento

As modalidades empregadas para tratamento de câncer de pele são as mesmas utilizadas para tratar outros tipos de câncer, sendo elas a cirurgia, quimioterapia, imunoterapia e radioterapia. No caso de câncer de pele do tipo não melanoma, a cirurgia é o tipo de tratamento mais indicado, possibilitando a remoção por completo do tumor no local afetado. No caso de melanoma metastático, que geralmente apresenta pior prognóstico, principalmente quando detectado em um estágio mais avançado, as terapias como a quimio, imuno e

radioterapia, quando utilizadas isoladamente, não se apresentam muito eficazes (Riker *et al.* 2005).

Diferentemente de outros tipos de cânceres, os melanomas são geralmente resistentes à quimioterapia e radiação mesmo nas fases iniciais da doença. A cirurgia é, portanto, a principal forma de tratamento, na qual, se mal sucedida, deixa poucas opções de tratamento adicional (Schwartz *et al.*, 2008; Murchison *et al.*, 2011). Porém, a utilização das terapias citadas acima aliadas ao procedimento cirúrgico de remoção da massa tumoral podem aumentar as chances de eliminação da doença, este tipo de tratamento é denominado terapia adjuvante.

A terapia adjuvante tem conquistado um papel promissor no tratamento do câncer localmente avançado; se distingue como terapia adjuvante pós-operatória convencional, realizada após a cirurgia definitiva para a remoção de todas as evidências da doença e terapia neoadjuvante, em que a intervenção médica ou imunológica sistêmica é dada antes da conclusão do tratamento cirúrgico definitivo (Geskin *et al.*, 2003).

Por exemplo, as vantagens práticas e teóricas da quimioterapia primária são reduzir o tamanho do tumor e aumentar a taxa de cirurgia conservadora do tecido afetado ou tornar operáveis tumores localmente avançados; impedir o crescimento dos focos metastáticos após a remoção do tumor primário; diminuir o potencial de clones químio-resistentes; avaliar a sensibilidade tumoral *in vivo* e permitir o estudo dos marcadores biológicos como receptores hormonais (Carvalho Pessoa *et al.*, 2007).

Cirurgiões, médicos e dermatologistas da área oncológica se voltaram para intervenções de terapia adjuvante dirigida a pacientes com melanoma que se submeteram a procedimento cirúrgico, mas o risco de recidiva da doença e mortalidade ainda permanece. Muitos ensaios clínicos têm sido realizados para investigar terapias adjuvantes para o melanoma visando melhorar a sobrevida global e sem recidiva. Na maioria das vezes, os resultados obtidos em ensaios de quimioterapia, vacinas tumorais, hormonais e agentes testados falharam em demonstrar benefícios significativos duráveis e reproduzíveis (Lee *et al.*, 2012).

Diversas linhagens celulares de melanoma murino ou humano são utilizadas como modelo experimental tanto *in vitro* quanto *in vivo* para avaliar o

comportamento de substâncias em relação à possível atividade antitumoral. A linhagem de células B16 é a mais utilizada como modelo experimental de forma geral. Existem duas variantes dessa linhagem celular, a B16-F1, que tem baixa atividade metastática e a B16-F10, que possui alto poder de metástase (Herlyn e Fukunaga-Kalabis, 2010).

A linhagem B16 foi explantada há mais de 60 anos a partir de um tumor quimicamente induzido em camundongos C57BL/6 e a variante F10 foi explantada por Fidler e Nicolson em 1976 através de várias passagens em série realizadas nestes camundongos. Desde então, esta linhagem continua sendo amplamente utilizada como modelo experimental, apresentando algumas vantagens no cultivo *in vitro* como, por exemplo, bom crescimento e adesão. Essa linhagem também se demonstra como um ótimo modelo *in vivo*, isso devido à sua fácil adaptação ao microambiente do hospedeiro, bom crescimento e progressão, e, além do mais, serve como um bom modelo de metástase, uma vez que essa linhagem celular é altamente metastática nos pulmões (Herlyn e Fukunaga-Kalabis, 2010).

Estudos em busca de novos princípios ativos candidatos a fármacos que combatem o câncer têm revelado alguns componentes de venenos de serpentes com potencial atividade antitumoral. Sabe-se, por exemplo, que alguns componentes de venenos ofídicos pertencentes à certas famílias de proteínas podem influenciar no ciclo celular, induzir apoptose, inibir metastatização, reduzir massa e/ou progressão tumoral em ensaios tanto *in vitro* quanto *in vivo* (Markland, 1998; Kamiguti, 2005; Gomes *et al.*, 2010). Algumas toxinas já são bem caracterizadas e estudadas, outras ainda não. Dentre as toxinas mais conhecidas estão a crotoxina (*Crotalus durissus terrificus*), a contortostatina (*Agkistrodon contortrix contortrix*) e a jararagina (*Bothrops jararaca*).

1.3. Venenos ofídicos

Muitos animais produzem uma diversidade de venenos e secreções que têm a finalidade de imobilizar, matar e digerir suas presas, assim como de se defenderem de seus predadores. Dentre estes, os venenos de serpentes são os

fluidos secretórios que possuem maior concentração de toxinas (Stocker, 1990) e causam uma variedade de efeitos biológicos. As serpentes venenosas são classificadas em cinco famílias: *Atractaspididae*, *Elapidae*, *Viperidae*, *Colubridae* e *Hydrophiidae*, e pertencem à superfamília *Colubroidea* (Całkosiński *et al.*, 2010).

Venenos de serpentes constituem uma complexa mistura de proteínas, peptídeos, polipeptídeos, nucleotídeos e íons inorgânicos que, combinados, conferem ao veneno um vasto e eficaz conjunto de propriedades tóxicas, contudo de grande interesse para o desenvolvimento de modelos de investigação da função e estrutura de proteínas, bem como para a busca de novos fármacos (Koh *et al.*, 2006; Qiu-Min *et al.*, 2010).

A maioria das toxinas são polipeptídeos e proteínas (aproximadamente 90-95% do peso seco do veneno) que podem apresentar atividade enzimática ou não-enzimática. Essas toxinas são capazes de induzir uma série de respostas fisiológicas no organismo afetado, sendo elas neurotóxicas (pré/pós-sináptica), cardiotoxinas, miotóxicas, coagulantes (pró ou anticoagulante), hemostáticas (ativação/inibição) hemorrágicas e, possivelmente, ações nefro ou hepatotóxicas. Essa combinação de efeitos biológicos faz com que os venenos de serpentes sejam altamente eficientes em matar/digerir uma presa ou vítima (Chippaux *et al.*, 1991; Całkosiński *et al.*, 2010).

Ao fracionar o veneno total de uma serpente, pode-se encontrar enzimas como serinoproteinases, metaloproteinases, acetilcolinesterases (AChEs), L- aminoácido oxidases (LAOs), fosfolipases A₂ (PLA₂) e B, nucleotidases (5'-nucleotidases, ATPases, fosfodiesterases e DNases) e hialuronidases (Markland, 1998; Kang *et al.*; 2011) e entre as toxinas com atividade não enzimáticas estão as toxinas tipo *three-finger*, as disintegrinas e as lectinas tipo C (Sajevic *et al.*; 2011).

A composição do veneno é espécie-específica, ou seja, na maioria das vezes predominam neurotoxinas nos venenos de *Elapidae* e *Hydrophiidae*, enquanto substâncias citotóxicas e anticoagulantes/coagulantes são mais frequentemente encontradas nos venenos de *Viperidae*, *Elapidae* e *Colubridae* (Larréché *et al.*; 2008; Del Brutto & Del Brutto, 2012).

As neurotoxinas são os componentes que agem no sistema nervoso do organismo afetado. Sua ação pode causar paralisia afetando a transmissão

neuromuscular em ambos os níveis pré ou pós-sinápticos. Neurotoxinas pré-sinápticas são proteínas do tipo fosfolipase A₂, chamadas de β-neurotoxinas. Elas causam a degeneração no terminal intramuscular de nervos e axônios e induzem paralisia inibindo a liberação de acetilcolina (ACh) a partir do terminal pré-sináptico (Kuruppu *et al.*, 2008). Tal inibição pode ser irreversível já que estas toxinas interferem na formação de novas vesículas de ACh. Geralmente, a atividade catalítica destas neurotoxinas é Ca²⁺ dependente. Entre algumas β-neurotoxinas estão a taipoxina, viperotoxina, textilotoxina e crotoxina (Del Brutto & Del Brutto, 2012).

Neurotoxinas de ação pós-sináptica se ligam especificamente e com alta afinidade aos receptores nicotínicos de acetilcolina (nAChR) localizados na junção neuromuscular esquelética. Elas agem bloqueando a transmissão de impulsos nervosos causando paralisia muscular e levando a presa/vítima à morte por asfixia (Larréché *et al.*; 2008). As neurotoxinas que exercem este papel são proteínas do tipo *three-finger* (Tsetlin e Hucho, 2004). Uma das neurotoxinas melhor caracterizadas é a irditoxina. Alguns venenos podem conter tanto α quanto β-neurotoxinas, produzindo complexos bloqueios de transmissão neuromuscular (Del Brutto e Del Brutto, 2012).

Há também as toxinas de venenos de serpentes que interferem nos processos homeostáticos do organismo afetado, onde várias classes de proteínas que compõem esses venenos apresentam tal atividade. As metaloproteinases ou SVMPs (Snake Venom Metalloproteinases) são classificadas de P-I até P-III de acordo com a organização de seus domínios. As SVMPs da classe P-I contém um único domínio catalítico metaloproteinase (MP) e possui massa molecular de 20 a 30 kDa. Esta estrutura é a mais simples de todas as metaloproteinases. No caso das SVMPs de classe P-II, o domínio MP é seguido de um domínio disintegrina (Dis) e a molécula possui massa de aproximadamente 30 a 60 kDa. Já as SVMPs P-III apresentam os dois domínios MP e Dis seguidos de mais um domínio rico em cisteína, onde a massa da molécula pode variar de 60 a 100 kDa. Há um tipo de SVMP heterotrimérica que contém um domínio lectina tipo C similar, inicialmente classificada como uma SVMP P-IV. Entretanto, ela foi incluída como subclasse (P-III_d) no grupo P-III, visto que até o momento não foi encontrada

nenhuma P-IV transcrita de mRNA (Gutiérrez *et al.*, 2005; Kang *et al.* 2011; Takeda *et al.*, 2012).

Uma série de atividades biológicas exercidas pelas SVMs já foram identificadas, como a atividade hemorrágica, formação de edema, hipotensão, inflamação e necrose. Por exemplo, ativadores de protrombina dos grupos A e B são SVMs, vários ativadores de fator X da cascata de coagulação já foram isolados e entre os mais estudados estão a RVV-X proveniente do veneno da serpente *Daboia russelli* e o VLFXA proveniente do veneno de *Macrovipera lebetina*. Ambas são metaloproteínases da classe P-III e pertencem também à subclasse P-III_d. Há ainda metaloproteínases fibrin(ogen)olíticas, inibidoras de agregação plaquetária, hemorraginas (ex. Jararagina) e inibidoras de inativadores de serinoproteínases (*serpinas*) (Sajevic *et al.*, 2011).

As disintegrinas são uma família de proteínas pequenas (41-83 resíduos de aminoácidos), não enzimáticas, ricas em cisteínas e em sua maioria são encontrados em venenos de *Viperidae*, porém algumas já foram identificadas também em venenos de *Elapidae*. São compostos que podem ser encontrados livremente nos venenos de serpentes ou associados à metaloproteínases dos tipos P II e P III, onde podem ser liberados após clivagem proteolítica, quando algumas disintegrinas se tornam, então, monômeros ou dímeros (Calvete *et al.*, 2005 ; Seoane *et al.*, 2010).

Outro tipo de toxina são as serinoproteínases SVSPs (Snake Venom Serineproteínases) que apresentam algumas proteínas com atividades biológicas iguais às SVMs, no entanto, existem SVSPs com característica trombina-like e outras que são ativadoras plasminogênicas, do fator V, fator VII e de proteína C. A massa molecular das serinoproteínases varia de 26 a 67 kDa (Kini *et al.*, 2005; Sajevic *et al.*, 2011).

As L-aminoácido oxidases (LAAOs) são flavoenzimas que têm a função de catalisar a deaminação oxidativa de um substrato L-aminoácido a um α -cetácido adicionalmente à produção de amoníaco e peróxido de hidrogênio (Samel *et al.*, 2006). Este tipo de enzima pode ser encontrado em muitos organismos diferentes e as LAAOs de venenos de serpente são os membros mais estudados desta família de proteínas. Antes da década de 90, os estudos realizados com LAAOs de venenos de serpente eram focados principalmente em

suas propriedades enzimáticas e físico-químicas, como mecanismo de reação e ativação por mudanças de pH ou congelamento (Du *et al.*, 2002). A massa molecular dessas proteínas varia de 110 a 150 kDa.

Com relação ao efeito hemostático as LAAOs têm a capacidade de influenciar o processo de agregação plaquetária, indução de edema, hemorragia e apoptose celular, além de efeitos antibacterianos, anticoagulantes e anti HIV. Todos provavelmente mediados pelo peróxido de hidrogênio liberado como produto de catálise destas proteínas (Gomes *et al.*, 2010; Kang *et al.*, 2011).

Uma das toxinas derivadas não somente de venenos de serpente como de outros animais e amplamente estudadas são as fosfolipases A₂ (PLA₂). Essas proteínas catalisam a hidrólise da ligação ester sn-2 em glicerofosfolípídeos de membrana, gerando ácido graxo e lisofosfolípídeos. *In vivo*, a posição sn-2 de fosfolípidos frequentemente contém ácidos graxos poli-insaturados, que podem ser metabolizados para formar eicosanóides ou fatores de ativação plaquetária a partir do ácido araquinônico clivado, além de vários mediadores lipídicos bioativos relacionados (Burke & Dennis, 2009). O lisofosfolípídeo restante pode também ter um papel importante em processos biológicos. Ou seja, as PLA₂ desempenham um papel central em diversos processos celulares, incluindo a digestão e metabolismo de fosfolípídeos, defesa do hospedeiro e transdução de sinal (Dennis, 1994). Além do efeito neurotóxico, as PLA₂ também apresentam efeitos miotóxicos, citotóxicos e podem influenciar na coagulação sanguínea, adesão celular e agregação plaquetária.

1.4 Venenos de serpente e câncer

Algumas moléculas derivadas de venenos ofídicos são utilizadas 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). Visto o potencial terapêutico que alguns

componentes de serpente apresentam, muitos estudos se dedicam à descoberta de componentes provenientes de venenos de serpente com a finalidade terapêutica em variados tipos de tumores.

Venenos de serpentes e toxinas derivadas de venenos de serpente que apresentam alguma atividade antitumoral podem exercer tal função através de diversos mecanismos de ação.

El-Refael e Sarkar (2009) estudaram os efeitos do veneno total de *Cerastes cerastes* (CCV) no crescimento e morfologia de células de tumor mamário murino da linhagem RIII/As-MT. Os resultados obtidos mostraram que o veneno desta serpente matou um número significativo de células em experimentos *in vitro*. No mesmo estudo, o veneno administrado em camundongos reduziu aproximadamente 54% da massa tumoral dentro de um período de cinco semanas, conseqüentemente, os camundongos tratados com CCV apresentaram maior sobrevida em comparação aos camundongos não tratados. O suposto mecanismo através do qual o CCV afetou o tumor em ambos os experimentos seria a via de morte celular por necrose.

Outro estudo utilizando o veneno total da serpente *Hydrophis spiralis* sugere que o efeito antitumoral *in vivo* em carcinoma ascítico de Ehrlich se dá pela ativação de vias apoptóticas (Karthikeyan *et al.*, 2007).

Atualmente, diversos estudos mostram que a indução de apoptose está associada com a atividade de muitos agentes antitumorais, podendo ocorrer por duas vias principais. Uma envolve a ligação com receptores de morte celular e é referida como a via extrínseca. A outra envolve mecanismos mediados por mitocôndrias e se refere como via intrínseca (Zhang e Wei, 2007).

Dentre os componentes derivados de venenos de serpentes que já apresentaram algum potencial antitumoral tanto em experimentos *in vitro* quanto *in vivo* estão proteínas que pertencem a algumas das famílias mais comumente encontradas nesse fluídos. São elas as LAAOs, SVMPs, disintegrinas, cardiotoxinas e fosfolipases tanto A₂ quanto B.

Estudos realizados com LAAOs revelam que essas proteínas apresentam diversos efeitos sobre organismos biológicos incluindo a indução ou inibição de agregação plaquetária. Além disso, as LAAOs também podem induzir a morte celular em linhagens de células de mamíferos. O efeito citotóxico das

LAAOs é atribuído em grande parte à formação de elevadas concentrações locais de peróxido de hidrogênio (H_2O_2). É interessante notar que a apoptose induzida por LAAOs tem sido relatada como sendo diferente do que a causada pelo H_2O_2 exógeno (Naumann *et al.* 2011).

Um dos fatores que torna os tumores de melanoma maligno altamente invasivos é a alteração dos padrões de moléculas de adesão celular como as subunidades de integrinas $\alpha 1$, $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\beta 1$, $\beta 3$ e $\beta 4$. As integrinas como as $\alpha v \beta 3$ e $\alpha 5 \beta 1$ são altamente expressas em células tumorais e, portanto, têm sido o alvo de estudo no desenvolvimento de drogas que possam causar diversos efeitos como inibição de migração celular e agregação plaquetária, indução de apoptose e angiogênese. Dentre as moléculas encontradas nos venenos de serpente que apresentam essa atividade estão as disintegrinas e as metaloproteinases do tipo P-II e P-III (Selistre de Araújo, 2010; Klein *et al.*, 2011).

No caso das proteínas da família das PLA_2 , os mecanismos de atividade antitumoral que essas moléculas participam ainda não estão totalmente esclarecidos, porém, estudos mostram que algumas PLA_2 derivadas de venenos de serpentes podem reduzir massa tumoral *in vivo*, inibir agregação plaquetária, adesão celular, migração celular e apresentar citotoxicidade *in vitro*. Um estudo recente mostrou que as PLA_2 também exercem um papel importante nos receptores do tipo integrina, que é fundamental para a ação antitumoral dessas moléculas (Daniele *et al.*, 1997; Rudrammaji e Gowda, 1998; Bazaa *et al.* 2009; Maity *et al.* 2007).

Todas estas considerações nos permite inferir a nítida e promissora utilização de venenos ofídicos para a identificação de novos compostos com ação antitumoral, seja pela complexidade dos venenos ou pela diversidade de serpentes existentes. Considerando-se que substâncias citotóxicas são mais frequentemente encontradas nos venenos de serpentes das famílias *Viperidae* e *Elapidae* (Larréché *et al.*, 2008; Del Brutto & Del Brutto, 2012), foram selecionadas para este estudo venenos de algumas espécies destas famílias.

2. OBJETIVO

Identificar e caracterizar componentes de venenos de serpentes das famílias *Viperidae* e *Elapidae* com potencial atividade antitumoral *in vitro* sobre células de melanoma murino B16-F10.

2.1. Objetivos específicos

- Avaliar a resolução do método de cromatografia líquida por troca aniônica.
- Avaliar a pureza das frações obtidas de cada veneno.
- Avaliar a citotoxicidade das frações selecionadas.
- Investigar a que família de proteína pertencem as frações com atividade antitumoral.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1. Venenos Ofídicos

Todos os venenos utilizados neste estudo foram cedidos pelo Dr. Peter J. Mirtschin (*Venom Supplies Pty Ltd, Australia*).

Tabela 1 - Nomes científico e popular das serpentes

Nome Científico	Nome Popular
<i>Acanthophis antarcticus</i>	Common death ader
<i>Agkistrodon bilineatus</i>	Tropical moccasin
<i>Notechis ater niger</i>	Peninsula tiger
<i>Notechis scutatus</i>	Mainland tiger
<i>Pseudonaja textilis</i>	Eastern brown snake

3.2. Cromatografia líquida de troca iônica

Para o fracionamento dos venenos a partir da separação dos compostos por cargas foi utilizada uma coluna de troca aniônica Mono-Q (GE Healthcare). A eluição das frações adsorvidas pela coluna, fase móvel, foi feita com Tris 50mM em pH 8,0 com um gradiente salino de Cloreto de Sódio (NaCl 1M) inicial de 100%. Para este procedimento foi utilizado o equipamento de HPLC da marca GE Helthcare.

3.3. Dosagem de Proteína

As concentrações protéicas das amostras utilizadas no decorrer dos experimentos foram determinadas pelo método de Bradford (1976). Nesta técnica, a interferência das proteínas com absorvância do corante Comassie Brilliant Blue G-250 em meio altamente ácido resulta em modificação proporcional da cor detectável em um comprimento de onda de 595 nm.

3.4. Concentração das frações por meio de centrifugação

Para o veneno da serpente *Notechis ater niger*, as frações que se apresentaram citotóxicas em células tumorais foram centrifugadas em tubos, do tipo eppendorf, contendo uma membrana com *cut-off* de 3KDa (Amicon®, Millipore). O volume inicial de 500µL de cada fração foi centrifugado a 14000g por 30 minutos, obtendo-se assim um volume final de 50µL. Este volume foi recuperado invertendo-se a membrana em um novo tubo e recentrifugando o volume que restou a 1000g por 2 minutos, onde foram adicionados 50µL do tampão que seria utilizado na exclusão molecular, totalizando um volume final de 100µL. Concentrando assim em 5x a amostra inicial.

3.5. Cromatografia Líquida de Exclusão Molecular

As frações citotóxicas concentradas do veneno de *Notechis ater niger* foram submetidas à cromatografia de exclusão molecular, visando separar as amostras por volume hidrodinâmico, que é inversamente proporcional ao tempo de retenção do analito. Uma coluna Superdex 75 10/300 GL (GE Healthcare) foi utilizada e a fase móvel para tal técnica de separação foi uma solução de Bicarbonato de amônio 100 mM. As amostras foram injetadas em um volume de 100µL e o fluxo utilizado foi de 600µL/min.

3.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A pureza das frações, assim como a eficiência dos métodos de fracionamento foram avaliadas qualitativamente por eletroforese, sob condições desnaturantes, redutoras e não redutoras, de acordo com o método descrito por Laemmli (1970). O gel de resolução foi preparado em uma concentração inicial de 15% de poliacrilamida e o gel de empilhamento foi feito com 4% de poliacrilamida. No preparo do gel de poliacrilamida os catalisadores para a reação de polimerização utilizados foram o persulfato de amônio e TEMED (N,N,N,N-tetrametiletilenodiamina). Após o fracionamento dos venenos, 40µL de cada fração foram diluídos em 10µL de tampão de amostra não redutor (glicerol, SDS 10%, Tris 1M, pH 6,8 e azul de bromofenol) e aquecidos a 70°C por 5 minutos.

Para o ensaio, apenas 10µL da solução previamente desnaturada foram aplicados ao gel de poliacrilamida e submetidos à eletroforese, utilizando uma voltagem constante de 90V. Para a visualização das frações o gel foi corado com Coomassie Blue G-250.

3.7. 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 proteinases nas amostras coletadas após o fracionamento do veneno total em coluna de afinidade.

Após a corrida de eletroforese, o gel foi lavado duas vezes durante 15 minutos em solução 2,5% de Triton X-100, para remoção do SDS, e, em seguida, o gel foi incubado no tampão do substrato (Tris-HCl 50 mM pH 8,0 e CaCl₂ 5 mM), a 37°C durante 20 horas. Foi utilizado como controle positivo o veneno total de *Bothrops jararaca*. Após a eletroforese o gel foi corado com solução corante Coomassie Blue G-250 (Blue Silver).

3.8. Western Blot

Após a separação eletroforética por SDS PAGE, as frações 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, utilizou-se como anticorpo primário o policlonal antijararagina na diluição (1:5000) e como anticorpo secundário, anti-IgG de coelho conjugado com peroxidase (1:5000). Para o controle positivo utilizou-se veneno total de *Bothrops jararaca*.

3.9. Cultura de Fibroblastos

Células murinas L929 (doubling-time:14h) foram descongeladas e semeadas em garrafas de 75 cm² utilizando meio de cultura RPMI 1640, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SFB), 1% da solução de estreptomicina/penicilina/anfoteicina (25µg/mL/50u/1,25µg/mL) e 1% de L-Glutamina. As passagens para ampliação de cultura foram realizadas a partir da tripsinização (tripsina/EDTA) das células e contagem em câmara de Neubauer. Após atingirem 80% de confluência as células foram plaqueadas para ensaio de citotoxicidade e congeladas para estoque das linhagens.

3.10. Cultura de células tumorais

A linhagem de célula tumoral utilizada foi a de melanoma murino B16-F10 (doubling-time:~18-20h), que foi cultivada seguindo os métodos de cultivo celular estabelecidos pela ATCC e, antes de atingirem 80% de confluência, foram subcultivadas para ampliação, ensaio de citotoxicidade e congelamento.

3.11. Ensaio de citotoxicidade (MTS)

Os ensaios com cada uma das frações oriundas do fracionamento dos cinco venenos estudados foram realizados pelo método colorimétrico utilizando o corante MTS (3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-5-(3-carboximetoxifenil)-2-(4sulfofenil)-2H-tetrazolio).

O teste de viabilidade celular avaliou a toxicidade que as frações dos venenos promoveram quando em contato com células em cultura (L929 - fibroblasto e B16-F10 - tumoral). Sua avaliação baseou-se na taxa de células viáveis restantes da ação tóxica do composto (Malich, 1997).

Após adição do MTS as absorvâncias de cada placa foram lidas em equipamento leitor de ELISA, utilizando um comprimento de onda de 490 nm e o cálculo de citotoxicidade para cada fração foi realizado a partir da viabilidade celular obtida, onde:

$$\text{citotoxicidade (\%)} = 100\% - \text{viabilidade (\%)}$$

3.12. Cálculos e análise estatística

Os cálculos para avaliar a especificidade das frações citotóxicas foram feitos por meio de análise estatística Two-Way ANOVA. Todos os cálculos e análises estatísticas foram feitos utilizando o software Graphpad Prisma 5.0. Para os cálculos de área dos picos utilizou-se o software AKTA/UNICORN 5.11 (GE Healthcare).

4. RESULTADOS

Os resultados a seguir estão apresentados por serpente analisada.

4.1. Veneno da serpente *Acanthophis antarcticus*

4.1.1. Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de *Acanthophis antarcticus*:

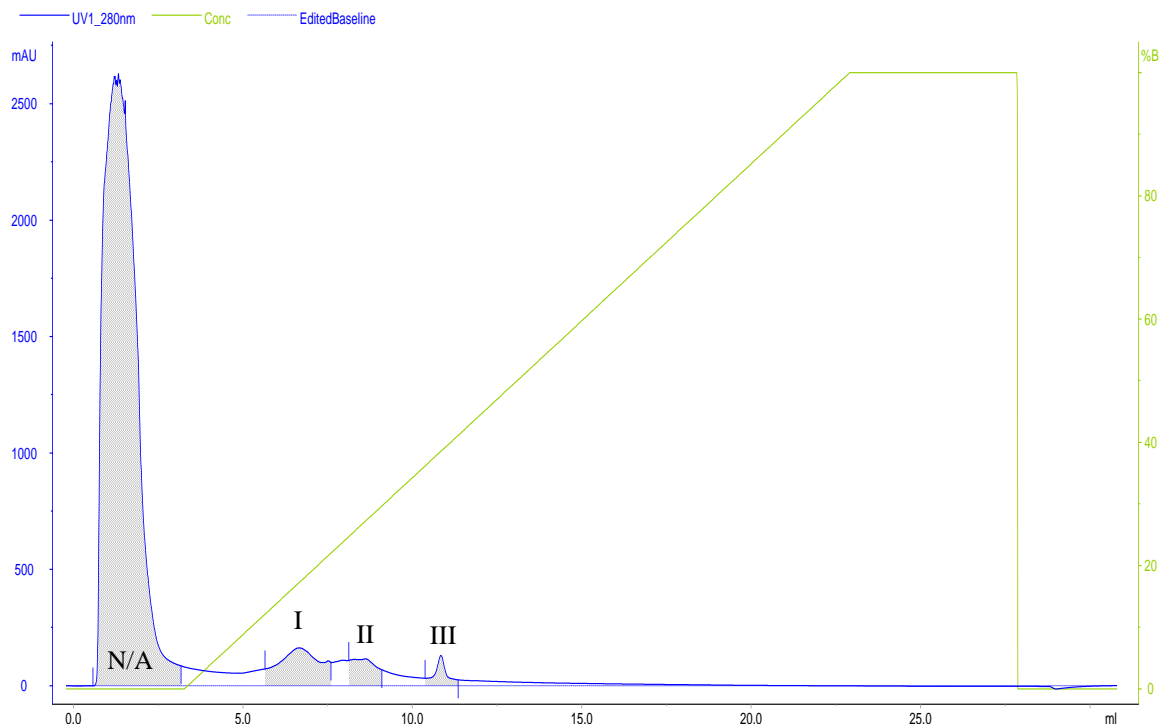


Figura 1- Perfil cromatográfico do veneno total de *A. antarcticus* (4,17mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 100% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

Na figura 1 observam-se 4 picos oriundos do fracionamento do veneno da serpente *Acanthophis antarcticus*. O perfil cromatográfico demonstra de forma clara a predominância de componentes catiônicos/neutros, uma vez que a área do pico não adsorvido é superior às áreas dos picos adsorvidos. Portanto, o primeiro pico corresponde à fração não adsorvida (N/A) pela coluna de troca

aniônica, visto que esta fração foi eluída antes do início do gradiente, e corresponde a aproximadamente 90% da área total dos picos apresentados (Tabela 2). Os 3 picos que apresentaram afinidade com a coluna eluíram com no máximo 15 mL. De todas as 3 frações adsorvidas pela coluna de troca aniônica, a fração I apresenta maior área (Tabela 2), seguida pelas frações II e III.

Tabela 2 – Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica representada na Figura 1

Frações	Retenção (ml)	Área (mAU*mL)	Área/Área do pico (volume) %	Altura (mAU)
N/A	1,32	29.752	88,55	2.630
I	6,64	2.310	6,88	163
II	8,62	1.003	2,98	116
III	10,84	533	1,58	131

4.1.2. Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de *Acanthophis antarcticus*:

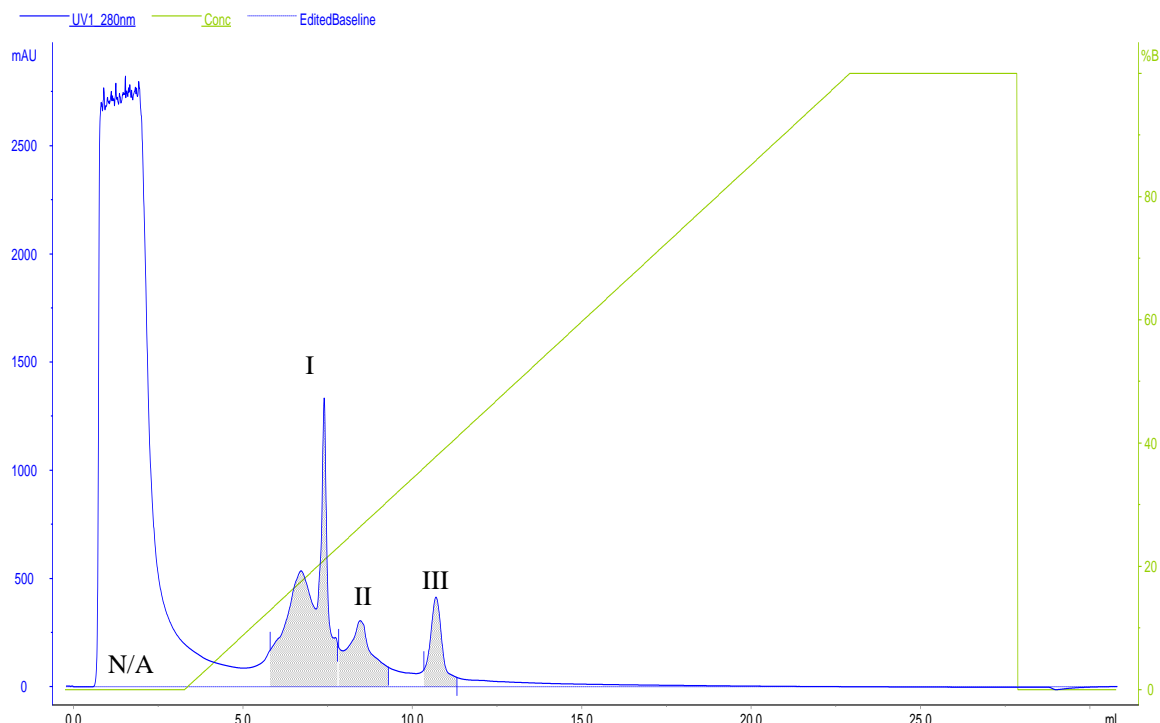


Figura 2- Perfil cromatográfico do veneno total de *A. antarcticus* (16,67mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 100% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

A figura 2 representa a cromatografia preparativa realizada com uma maior concentração de veneno total de *A. antarcticus* (16,67mg/mL). Observa-se que com o aumento da concentração de veneno total aplicado na coluna, o pico que corresponde à fração N/A (compõe 90% do veneno) não apresenta uma boa resolução visto que os limites de leitura do equipamento foram ultrapassados. Entretanto, as frações que foram adsorvidas pela coluna de troca aniônica apresentaram picos bem definidos, boa resolução e maiores valores de absorvância. As áreas demarcadas em vermelho correspondem às frações I, II e III, onde a fração com maior área e as demais frações foram iguais às da cromatografia analítica.

4.1.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente *Acanthophis antarcticus*

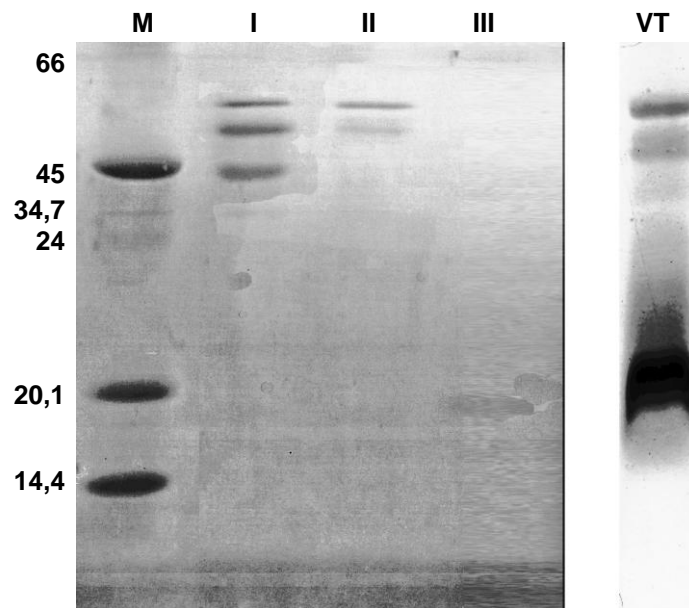


Figura 3- SDS-PAGE a 13% de poliacrilamida do veneno total (VT) de *A. antarcticus* e das frações obtidas na troca aniônica (I a III) em tampão de amostra não redutor. As massas moleculares do padrão (M) estão representadas à esquerda da figura e os valores estão em kDa.

A figura 3 ilustra o gel de poliacrilamida das três frações obtidas da cromatografia de troca aniônica do veneno de *Acanthophis antarcticus*. Observa-se que as duas primeiras frações se localizam na região de massa molecular entre 66 e 45kDa. A fração III apresenta uma única banda de baixa intensidade com massa molecular de aproximadamente 19kDa.

4.1.4. Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente *Acanthophis antarcticus*:

Tabela 3 – Concentração (mg/mL) das frações obtidas por cromatografia líquida de troca aniônica do veneno da serpente *A. antarcticus*:

Troca aniônica (Mono-Q)	
Fração	Concentração (mg/mL)
I	0,417
II	0,073
III	NQ

A Tabela 3 mostra que apenas a fração III obtida do veneno total de *Acanthophis antarcticus* em coluna de troca aniônica não foi quantificada (NQ).

4.1.5. Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente *Acanthophis antarcticus*:

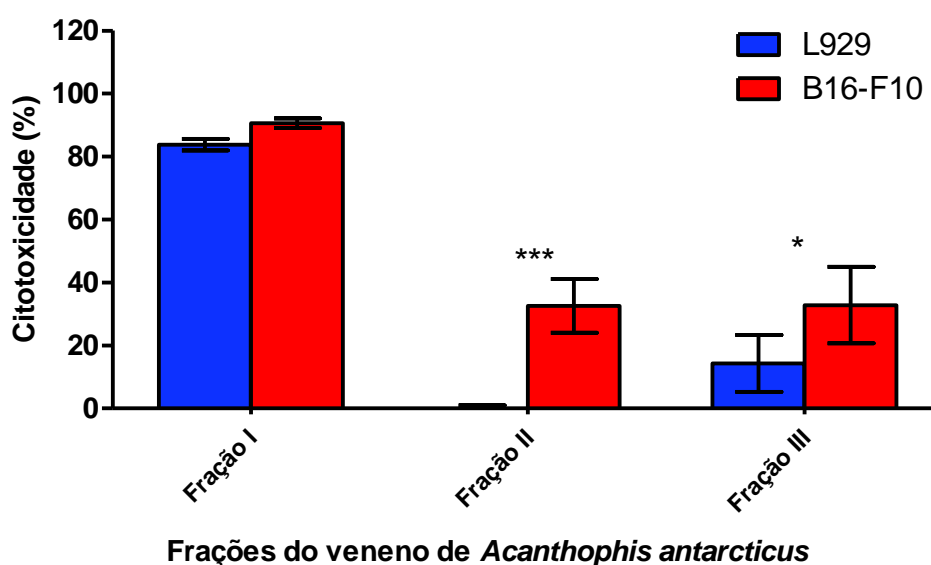


Figura 4 – Ensaio de citotoxicidade em células da linhagem L929 e B16-F10 realizado com as frações do veneno de *A. antarcticus* obtidas da cromatografia líquida de troca aniônica. As frações que apresentam valores significativos de citotoxicidade ($P < 0,05$ e $P < 0,001$) estão indicadas por * e ***, respectivamente.

A fração I da troca aniônica do veneno de *Acanthophis antarcticus* mostrou um alto efeito citotóxico em ambas as linhagens celulares, tanto o controle quanto a tumoral. As frações II e III foram menos citotóxicas em relação à

primeira, porém, a citotoxicidade é maior nas células tumorais para ambos os casos ($P < 0,001$ e $P < 0,05$, respectivamente). A fração II foi tóxica apenas para a linhagem tumoral.

4.2. Veneno da serpente *Agkistrodon bilineatus*

4.2.1. Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de *Agkistrodon bilineatus*:

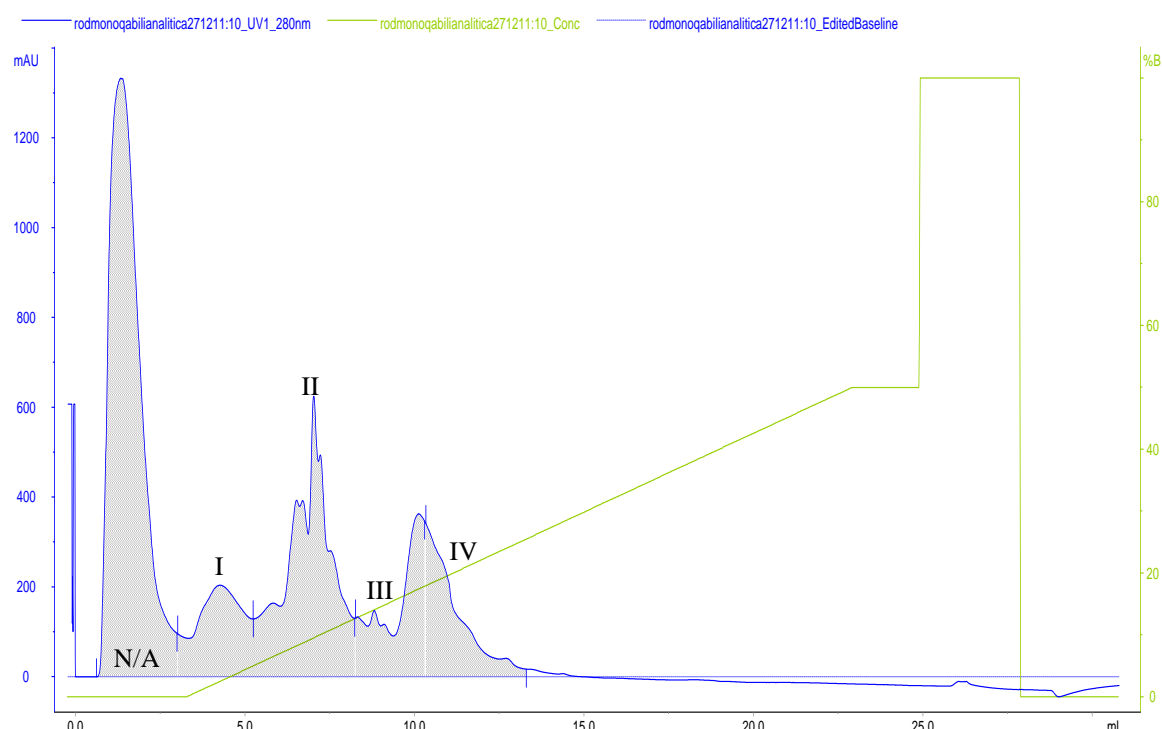


Figura 5- Perfil cromatográfico do veneno total de *A. bilineatus* (4,17mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 60% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

Tabela 4 – Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica representada na Figura 5

Frações	Retenção (ml)	Área (mAU*mL)	Área/Área do pico (volume) %	Altura (mAU)
N/A	1,33	14.316	43,87	1.333
I	4,25	3.310	10,14	204
II	7,03	7.900	24,21	625
III	10,12	3.605	11,05	363
IV	10,33	3.500	10,73	341

Na figura 5 foram observadas quatro frações do veneno de *Agkistrodon bilineatus*, eluídos da coluna de troca aniônica após aplicação do gradiente salino, e que correspondem a aproximadamente 56% da composição do veneno total injetado, com predominância de componentes com maior carga positiva. A cromatografia realizada não apresentou uma boa resolução, apresentando picos largos e não definidos. Segundo o cálculo realizado com a área total das frações ilustrado na tabela 4, o pico II apresenta maior área, seguido pelos picos III, I e IV.

4.2.2. Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de *Agkistrodon bilineatus*:

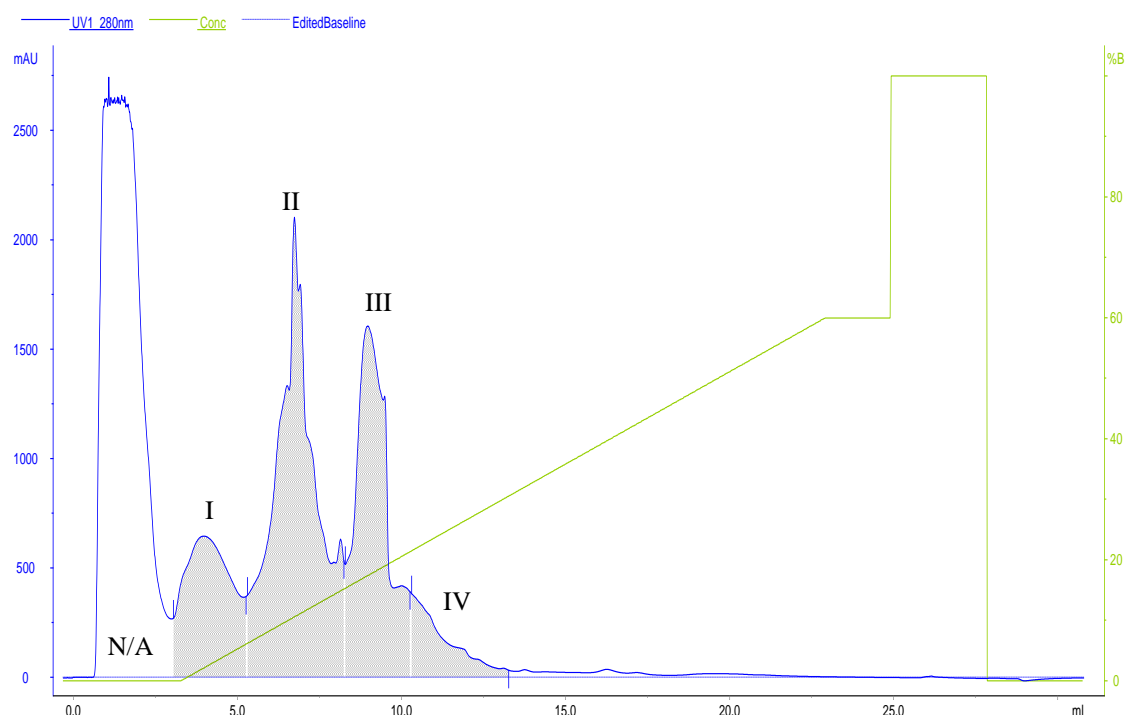


Figura 6- Perfil cromatográfico do veneno total de *A. bilineatus* (16,67mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 60% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

Ao observar o cromatograma apresentado na figura 6, nota-se que entre as 4 frações apresentadas, a fração II ainda tem maior área, seguido pela fração III. A fração IV é maior que a fração I. As áreas preenchidas correspondem às frações coletadas para os ensaios.

4.2.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente *Agkistrodon bilineatus*

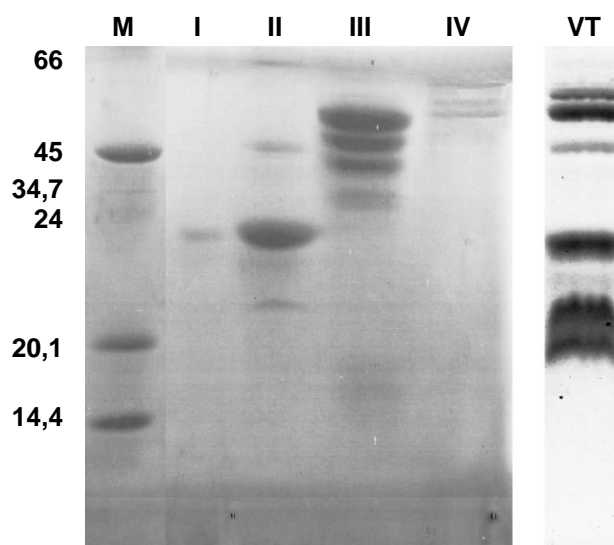


Figura 7- SDS-PAGE a 13% de poliacrilamida do veneno total (VT) de *A. bilineatus* e das frações obtidas na troca aniônica (I a IV) em tampão de amostra não redutor. As massas moleculares do padrão (M) estão representadas à esquerda da figura e os valores estão em kDa.

Na figura 7 observa-se que apenas a fração I apresenta-se com uma banda isolada em relação às demais frações. A fração II apresenta uma banda com maior intensidade na região de massa molecular de 24kDa e a fração III possui três bandas mais intensas entre as regiões de 50 e 40kDa. A fração IV apresentou 4 bandas com massas moleculares entre 66 e 45kDa.

4.2.4. Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente *Agkistrodon bilineatus*:

Tabela 5 – Concentração (mg/mL) das frações obtidas por cromatografia líquida de troca aniônica do veneno da serpente *A. bilineatus*:

Troca aniônica (Mono-Q)	
Fração	Concentração (mg/mL)
I	NQ
II	0,519
III	0,547
IV	0,071

4.2.5. Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente *Agkistrodon bilineatus*:

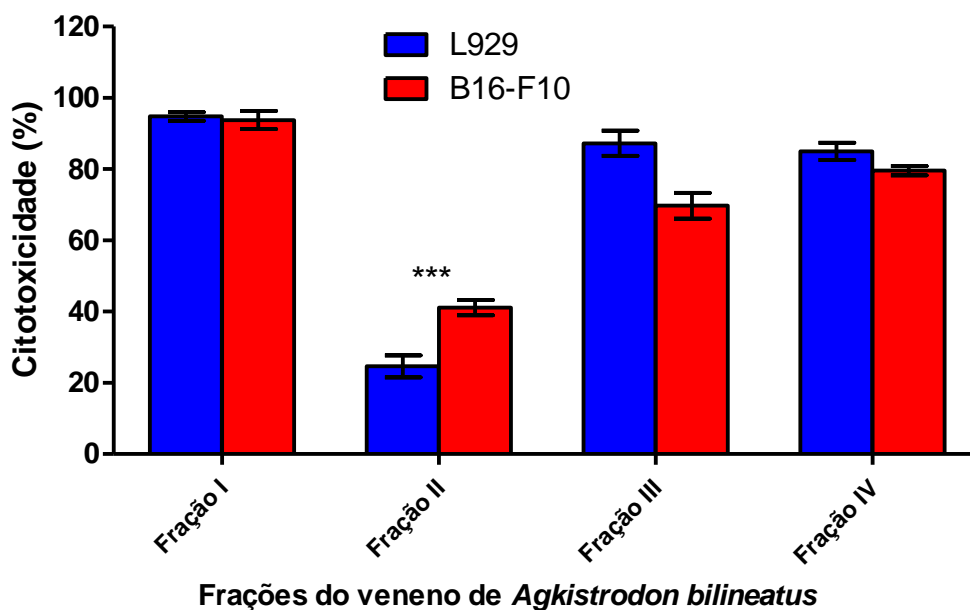


Figura 8 – Ensaio de citotoxicidade em células da linhagem L929 e B16-F10 realizado com as frações do veneno de *A. bilineatus* obtidas da cromatografia líquida de troca aniônica. As frações que apresentam valores significativos de citotoxicidade ($P < 0,001$) estão indicadas por ***.

Entre todas as frações utilizadas no ensaio, apenas a fração II apresentou maior citotoxicidade em células tumorais B16-F10 quando comparada às células de fibroblasto L929. A diferença entre as duas linhagens foi significativa ($P < 0,001$).

4.3. Veneno da serpente *Notechis scutatus scutatus*

4.3.1. Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de *Notechis scutatus scutatus*:

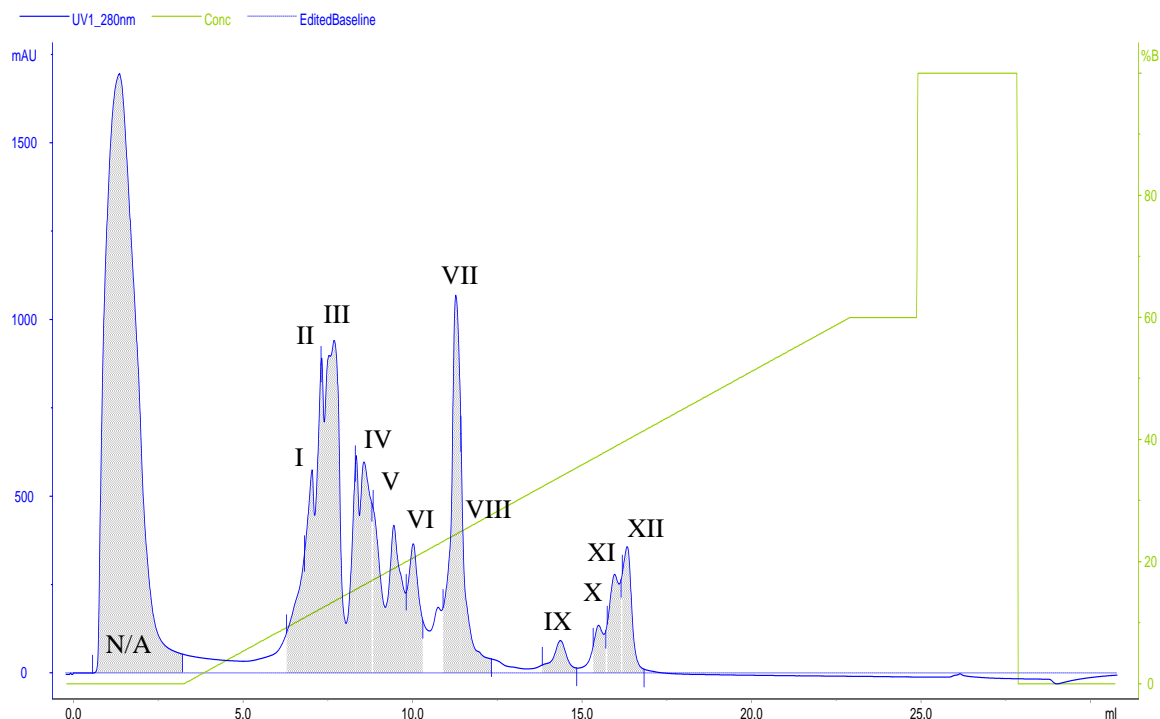


Figura 9- Perfil cromatográfico do veneno total de *N. scutatus scutatus* (4,17mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 60% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

A figura 9 ilustra o fracionamento do veneno da *Notechis scutatus scutatus* que não apresentou uma boa resolução de alguns picos. Observa-se que os primeiros picos encontram-se bastante sobrepostos, consequentemente, a largura dos mesmos é maior e apenas os picos VII e IX estão bem definidos. De acordo com os cálculos de área dos picos ilustrados na tabela 5, a fração N/A corresponde a aproximadamente 43% do veneno total, e o pico de maior área corresponde ao III, seguido pelos picos VII, V, IV, II, VI, VIII, I, XII, XI, IX, X.

Tabela 6 – Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica representada na Figura 9

Frações	Retenção (ml)	Área (mAU*mL)	Área/Área do pico (volume) %	Altura (mAU)
N/A	1,36	17.773	42,78	1.697
I	6,81	1.084	2,61	338
II	7,3	2.591	6,24	874
III	7,68	5.992	14,43	941
VI	8,34	2.627	6,33	615
V	8,84	2.934	7,06	467
VI	10,02	1.314	3,16	366
VII	11,27	3.175	7,64	1.069
VIII	11,42	1.134	2,73	677
IX	14,36	451	1,09	92
X	15,48	437	1,05	135
XI	15,96	981	2,36	279
XII	16,33	1.046	2,52	358

4.3.2. Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de *Notechis scutatus scutatus*:

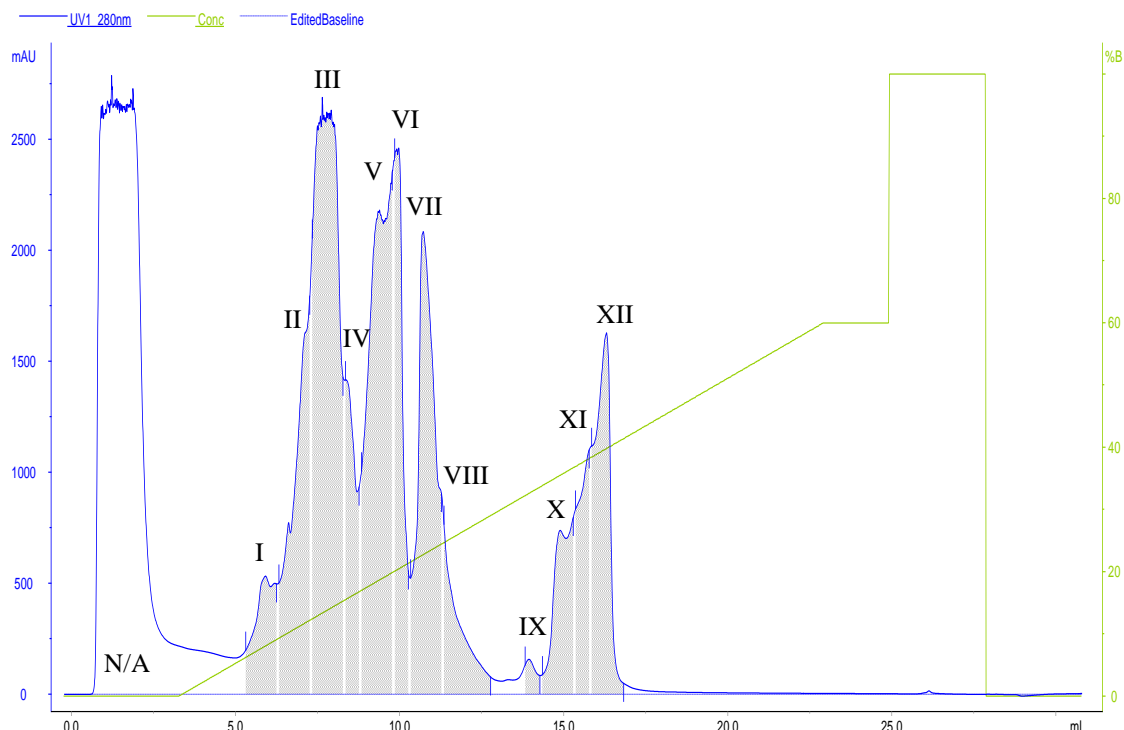


Figura 10- Perfil cromatográfico do veneno total de *N. scutatus scutatus* (16,67mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 60% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

Na figura 10 pode-se observar que a quantidade de veneno utilizada influenciou na resolução do cromatograma, onde alguns picos apresentados na cromatografia analítica (figura 9) ficaram completamente ocultos, resultando em apenas um ou dois picos largos no lugar dos 4 ou até cinco picos observados anteriormente. Nota-se também que a quantidade das primeiras frações eluídas após o início do gradiente salino está acima dos limites de detecção do equipamento de HPLC. Mesmo assim, optou-se pela separação de 12 frações para os ensaios futuros, onde a fração III apresenta maior área, seguida pelas frações V, VII, II, XII, VI, IV, X, XI, VIII, I, IX.

4.3.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente *Notechis scutatus scutatus*

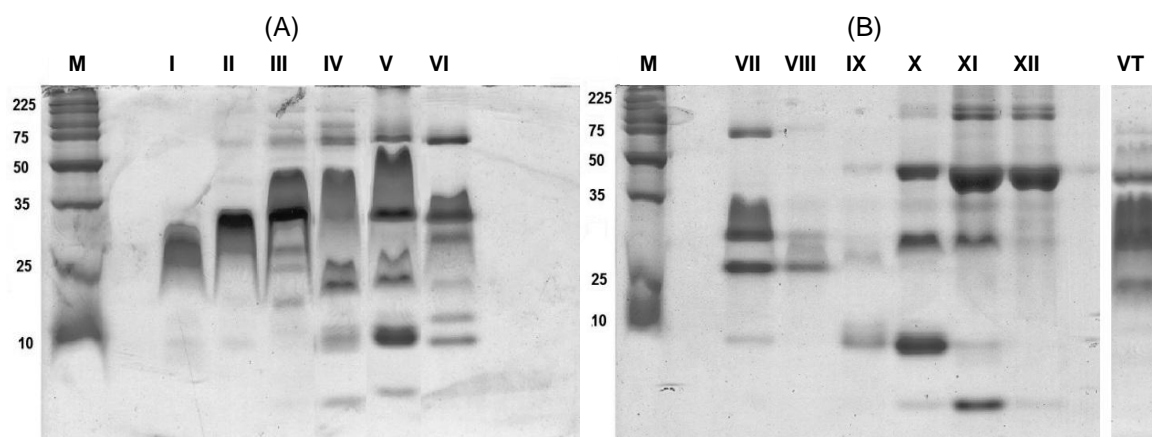


Figura 11- SDS-PAGE a 12% de poliacrilamida das frações do veneno de *Notechis scutatus scutatus* obtidas na troca aniônica, onde (A) são as frações de I a VI e (B) são as frações de VII a XII e o veneno total (VT), utilizando tampão de amostra não redutor. As massas moleculares do padrão (M) estão representadas à esquerda da figura e os valores estão em kDa.

Os géis ilustrados na figura 11 das frações do veneno da serpente *N. scutatus* são apresentados na ordem de I a VI (A) e de VII a XII (B). Cada fração apresenta uma grande variedade de compostos e de massas moleculares.

4.3.4. Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente *Notechis scutatus scutatus*:

Tabela 7 – Concentração (em mg/mL) das frações obtidas por cromatografia líquida de troca aniônica do veneno da serpente *N. scutatus scutatus*:

Troca aniônica (Mono-Q)	
Fração	Concentração (mg/mL)
I	0,232
II	0,729
III	0,907
IV	0,576
V	0,700
VI	0,455
VII	0,232
VIII	0,200
IX	0,094
X	0,517
XI	1,012
XII	0,640

4.3.5. Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente *Notechis scutatus scutatus*:

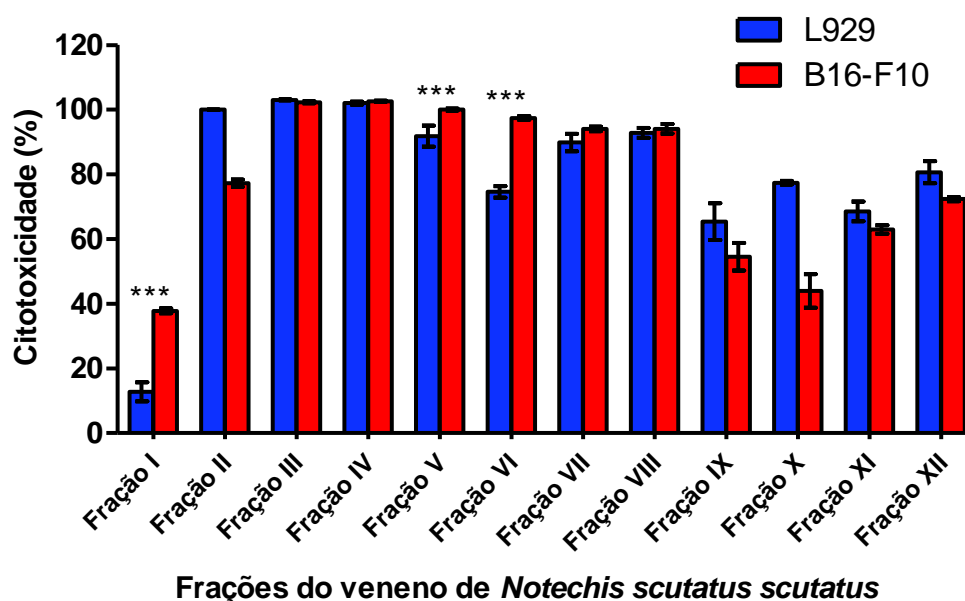


Figura 12 – Ensaio de citotoxicidade em células da linhagem L929 e B16-F10 realizado com as frações do veneno de *N. scutatus scutatus* obtidas da cromatografia líquida de troca aniônica. As frações que apresentam valores significativos de citotoxicidade ($P < 0,001$) estão indicadas por ***.

Na figura 12 a maioria das frações apresentou alta citotoxicidade para ambas as linhagens celulares, a fração I foi a menos citotóxica, porém foi mais eficiente em células tumorais ($P < 0,001$). As frações V e VI apresentaram alta taxa de morte celular e foram significativas em relação às células tumorais ($P < 0,001$).

4.4. Veneno da serpente *Pseudonaja textilis*

4.4.1. Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de *Pseudonaja textilis*:

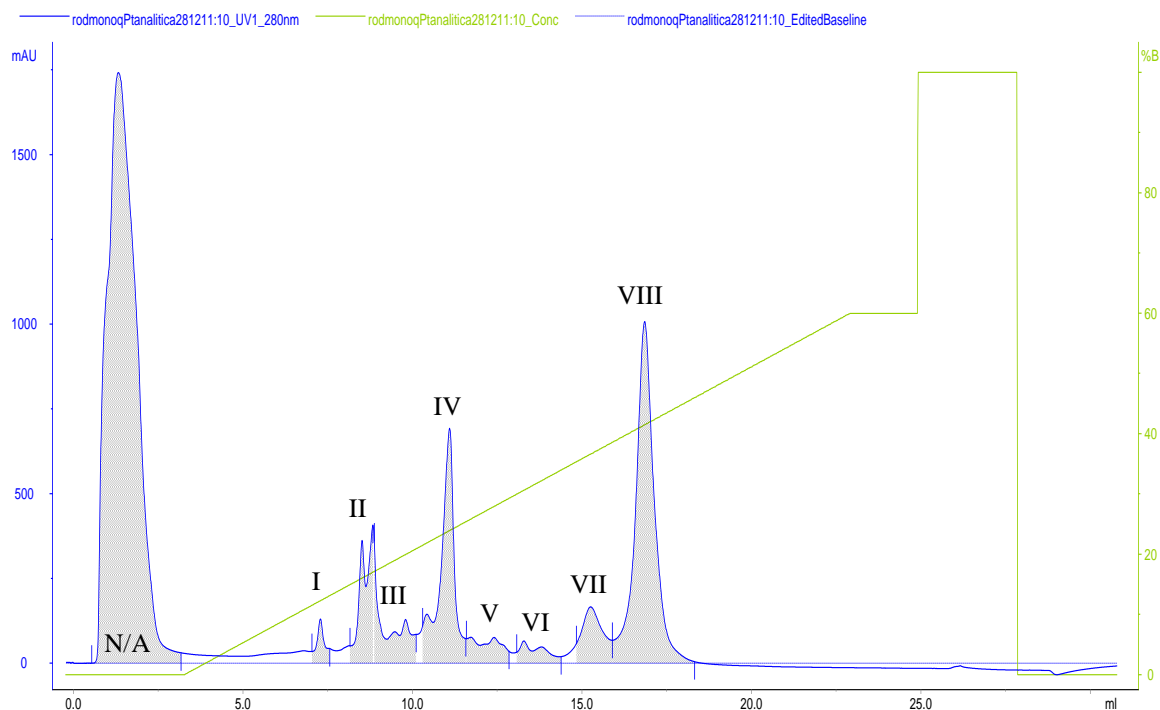


Figura 13- Perfil cromatográfico do veneno total de *P. textilis* (4,17mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 60% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

Tabela 8 – Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica representada na Figura 13

Frações	Retenção (ml)	Área (mAU*mL)	Área/Área do pico (volume) %	Altura (mAU)
N/A	1,32	17.681	54,79	1.743
I	7,28	350	1,08	131
II	8,51	769	2,38	363
III	8,83	1.295	4,01	407
IV	11,09	3.201	9,92	693
V	11,72	769	2,38	77
VI	13,29	508	1,58	66
VII	15,25	1.184	3,67	167
VIII	16,85	6.512	20,18	1.008

Na figura 13 foram detectados oito picos resultantes do fracionamento do veneno de *Pseudonaja textilis* que eluíram da coluna de troca aniônica. O cromatograma apresenta boa resolução com picos bem definidos, separados e não muito largos. O cálculo das áreas dos picos ilustrado na tabela 8 mostra que o pico de maior área adsorvido pela coluna foi o pico VIII, seguido pelos picos, IV, III, VII, II e V, VI, I. A fração N/A corresponde a aproximadamente 55% do veneno total aplicado no HPLC.

4.4.2. Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de *Pseudonaja textilis*:

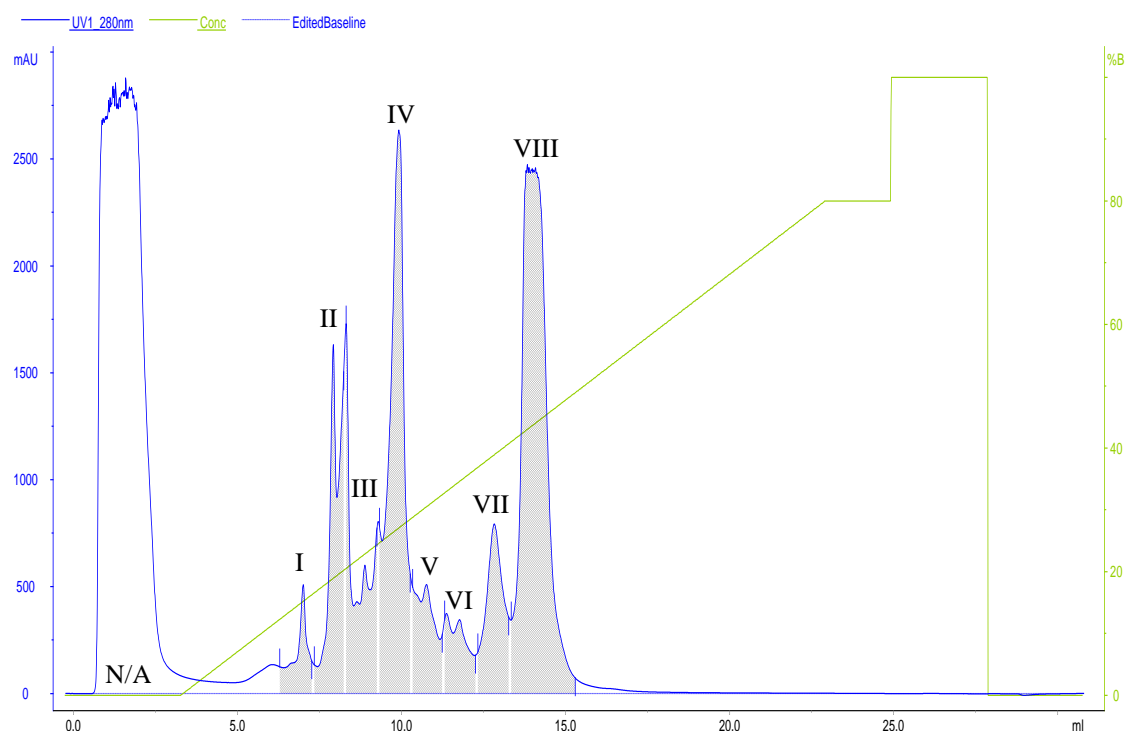


Figura 14- Perfil cromatográfico do veneno total de *P. textilis* (16,67mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 80% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

O cromatograma ilustrado na figura 14 indica que mesmo com uma maior quantidade de veneno a resolução permanece boa, ao passo que os picos apresentados ainda têm uma boa separação e definição. O pico VIII, que corresponde à fração de mesmo nome, ultrapassou os limites de detecção do equipamento, mas, mesmo assim, permaneceu como o pico de maior área, seguido pelos picos IV, II, III, VII, V, VI e I.

4.4.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente *Pseudonaja textilis*

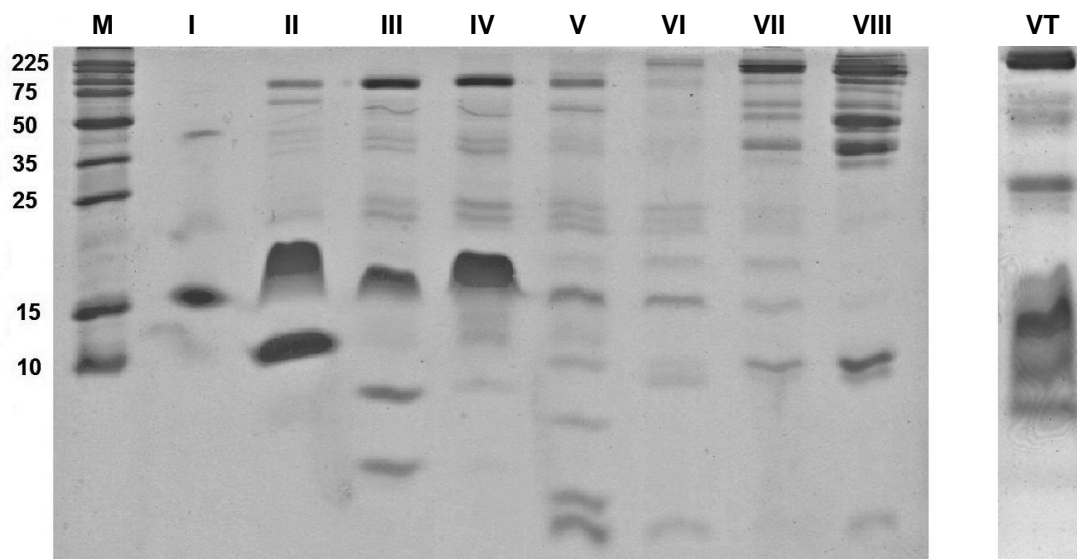


Figura 15- SDS-PAGE a 15% de poliacrilamida do veneno total (VT) do veneno de *P. textilis* e das frações obtidas na troca aniônica (I a VIII) em tampão de amostra não redutor. As massas moleculares do padrão (M) estão representadas à esquerda da figura e os valores estão em kDa.

Todos os picos na figura 15 apresentam uma grande variedade de compostos, mostrando que a técnica de fracionamento utilizada no presente trabalho para este veneno não foi capaz de separar os componentes com eficiência. Ao comparar as frações, muitos compostos ilustrados nesta figura parecem compartilhar a mesma massa molecular.

4.4.4. Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente *Pseudonaja textilis*:

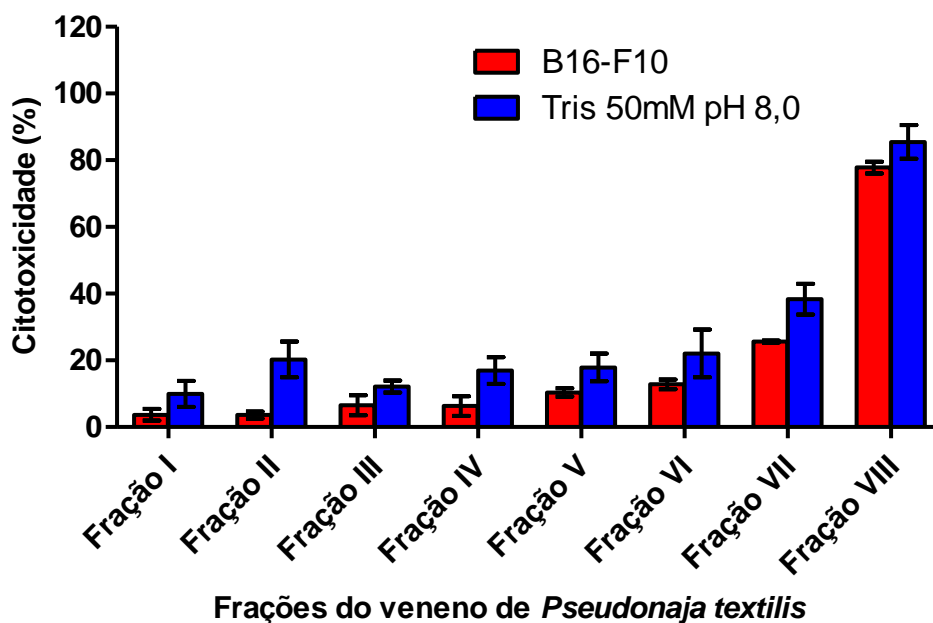


Figura 16 – Ensaio de citotoxicidade em células da linhagem B16-F10 realizado com as frações do veneno de *P. textilis* obtidas da cromatografia líquida de troca aniônica e a concentração salina do gradiente (Tris 50mM + NaCl em pH 8,0) correspondente à concentração salina presente em cada fração coletada.

Na figura 16 apenas a fração VIII apresentou uma alta citotoxicidade (77,80%) para as células tumorais, porém, pode-se observar que o tampão Tris utilizado sem a presença de toxina também apresentou alta citotoxicidade, ou seja, o teor de sal (NaCl) presente no tampão de Tris é que está causando esse efeito citotóxico.

4.5. Veneno da serpente *Notechis ater niger*

4.5.1. Cromatografia analítica (troca aniônica) do veneno de *Notechis ater niger*:

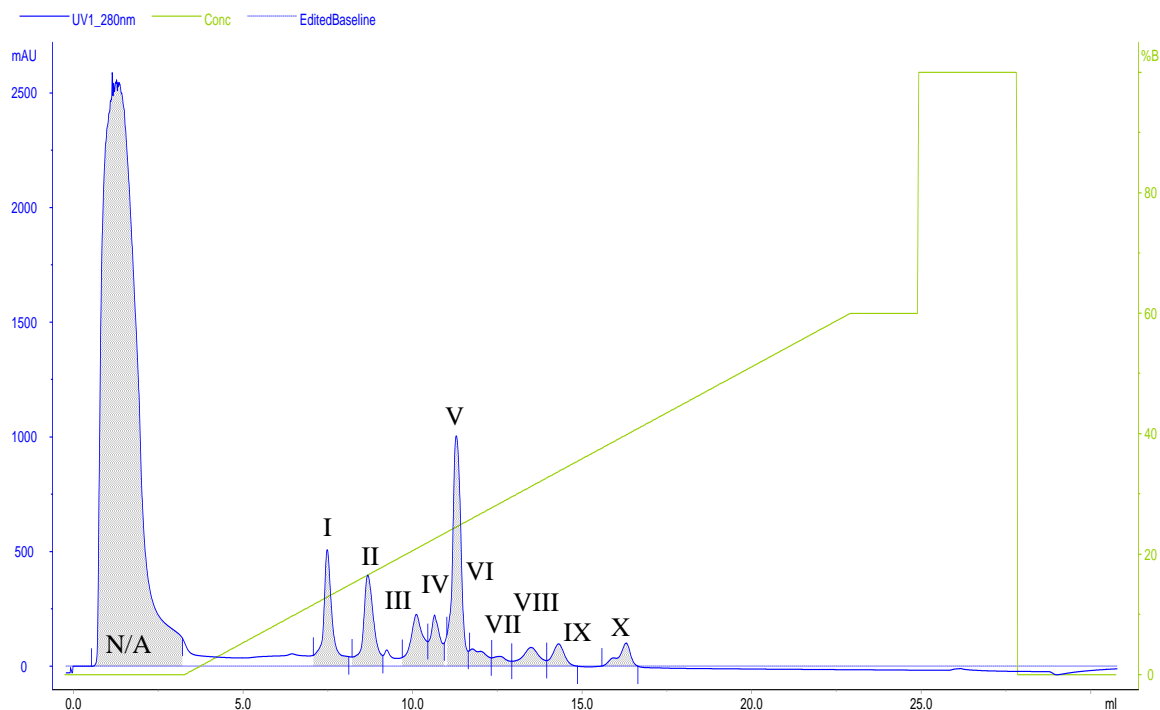


Figura 17- Perfil cromatográfico do veneno total de *N. ater niger* (4,17mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 60% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

Tabela 9 – Área dos picos das frações obtidas na cromatografia analítica representada na Figura 17

Frações	Retenção (ml)	Área (mAU*mL)	Área/Área do pico (volume) %	Altura (mAU)
N/A	1,14	29.160	75,47	2.590
I	7,48	1.564	4,05	509
II	8,68	1.426	3,69	398
III	10,11	971	2,51	226
IV	10,64	727	1,88	224
V	11,29	2.909	7,53	1.005
VI	11,76	379	0,98	75
VII	12,56	205	0,53	43
VIII	13,5	483	1,25	82
IX	14,3	393	1,02	97
X	16,3	419	1,08	101

No cromatograma apresentado na figura 17 são observados dez picos do veneno de *Notechis ater niger* eluídos da coluna de troca aniônica, pós gradiente salino. Todas as frações apresentaram boa resolução, visto que os picos no cromatograma possuem bandas bem definidas e separadas. O pico de maior área corresponde à fração V, seguidos dos picos I, II, III, IV, VIII, X, IX, VI e VII, respectivamente. No cálculo das áreas dos picos ilustrado na tabela 9, a maior parte dos componentes que constituem o veneno desta serpente não foi adsorvida pela coluna de troca aniônica (75,47% na Fração N/A).

4.5.2. Cromatografia preparativa (troca aniônica) do veneno de *Notechis ater niger*:

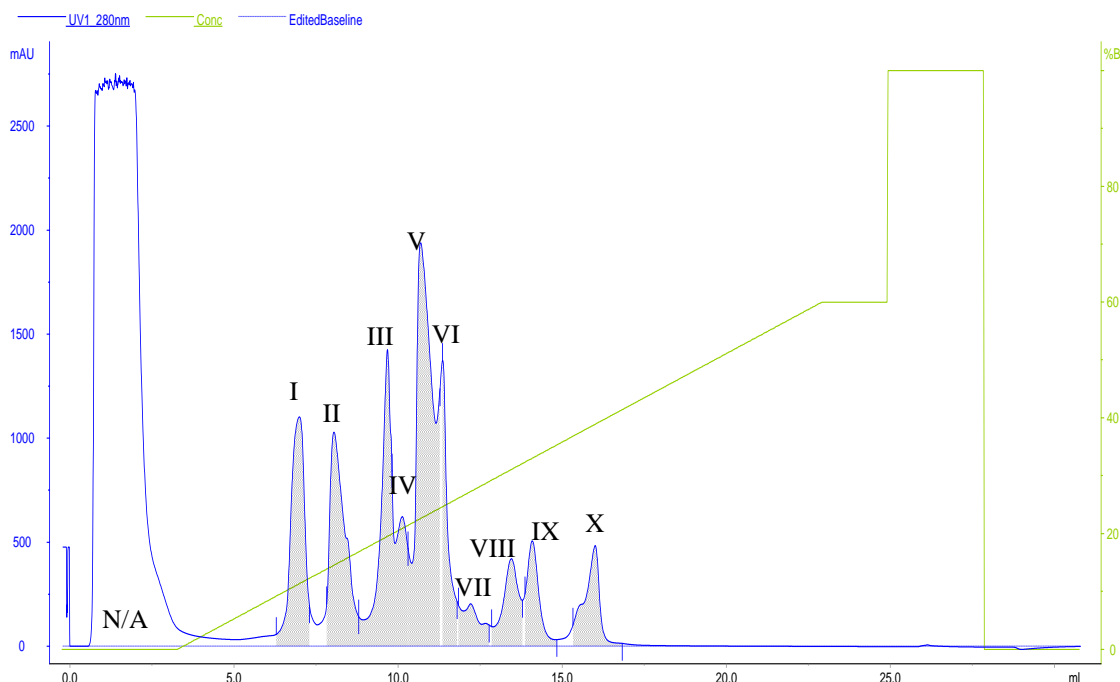


Figura 18- Perfil cromatográfico do veneno total de *N. ater niger* (16,67mg/mL) em coluna Mono-Q previamente equilibrada com Tris/HCl 50mM em pH 8,0. A absorvância foi determinada em 280nm e o gradiente utilizado foi de 0 a 60% de B (Tris/HCl 50mM + NaCl 1M em pH 8,0) a um fluxo de 0,8mL/min.

A figura 18 demonstra que a maior quantidade de veneno utilizada não alterou o perfil cromatográfico na sua resolução, com picos bem definidos. O pico V permaneceu como de maior área, porém a ordem dos picos que se seguem foi alterada da seguinte forma: II, III, I, VI, IV, X, VIII, IX, VII.

4.5.3. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) do veneno da serpente *Notechis ater niger*

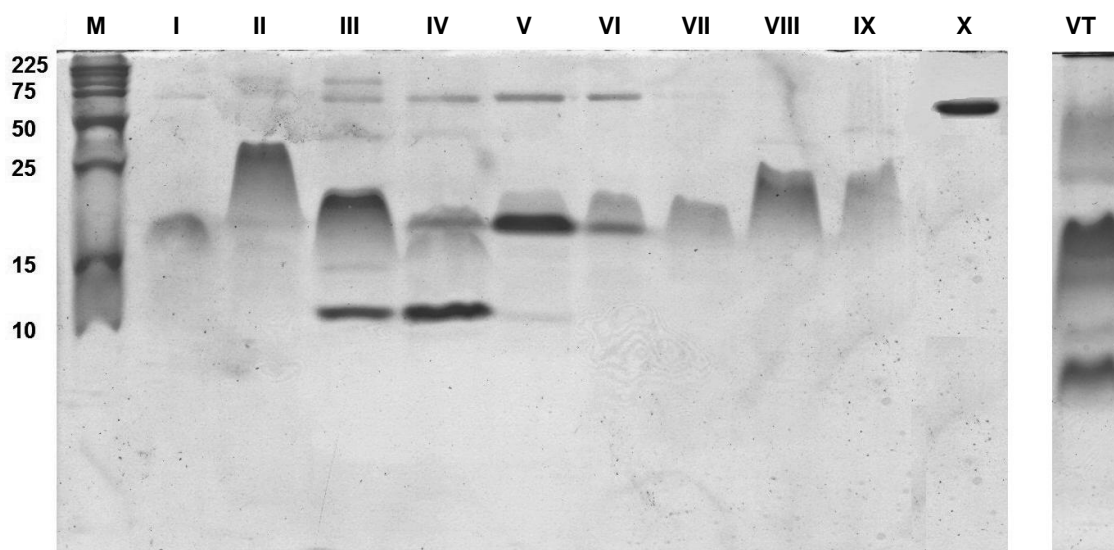


Figura 19- SDS-PAGE a 13% de poliacrilamida do veneno total (VT) de *N. ater niger* e das frações obtidas na troca aniônica (I a X) em tampão de amostra não redutor. As massas moleculares do padrão (M) estão representadas à esquerda da figura e os valores estão em kDa.

No gel indicado pela figura 19 observa-se que a maioria dos compostos apresentam massa molecular abaixo de 30 kDa. Algumas bandas presentes nas frações III, IV, V e VI parecem compartilhar alguns compostos devido a estes apresentarem massas moleculares semelhantes. Apenas a fração X apresentou uma banda isolada na região de 60kDa.

4.5.4. Dosagem de proteínas (Bradford) do veneno da serpente *Notechis ater niger*

Tabela 10 – Concentração (em mg/mL) das frações obtidas por cromatografia líquida de troca aniônica do veneno da serpente *N. ater niger*:

Troca aniônica (Mono-Q)	
Fração	Concentração (mg/mL)
I	0,145
II	0,154
III	0,419
IV	0,247
V	0,270
VI	0,161
VII	0,125
VIII	0,174
IX	0,102
X	0,340

4.5.5. Ensaio de citotoxicidade (MTS) do veneno da serpente *Notechis ater niger*

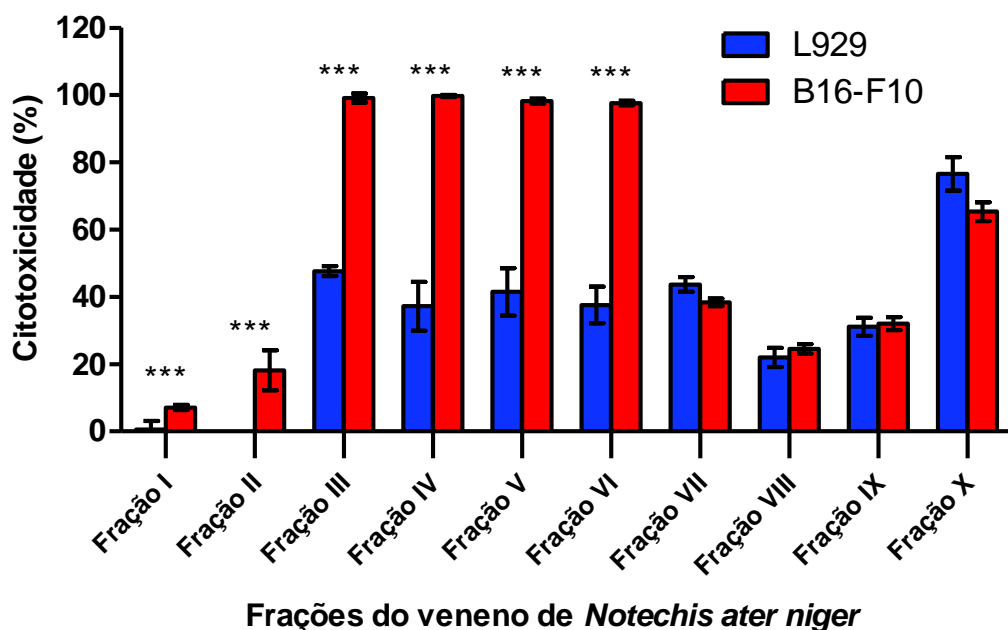


Figura 20 – Ensaio de citotoxicidade em células da linhagem L929 e B16-F10 realizado com as frações do veneno de *N. ater niger* obtidas da cromatografia líquida de troca aniônica. As frações que apresentam valores significativos de citotoxicidade ($P < 0,001$) estão indicadas por ***.

Das dez frações analisadas, seis delas foram mais citotóxicas nas células tumorais B16-F10 quando comparadas ao controle L929 ($P < 0,001$), as demais tiveram efeitos citotóxicos semelhante nas duas linhagens celulares ($P > 0,05$). A fração II apresentou citotoxicidade apenas na linhagem de células tumorais e as frações III, IV, V e VI se destacam por uma grande diferença de citotoxicidade entre as linhagens celulares ($> 50\%$).

4.6. Resultados das frações citotóxicas do veneno de *Notechis ater niger*

Devido aos resultados obtidos do screening dos venenos, optou-se por utilizar as frações que se apresentaram citotóxicas no veneno de *Notechis ater niger* para uma investigação mais aprofundada dos compostos presentes nessas frações.

4.6.1. Western Blot

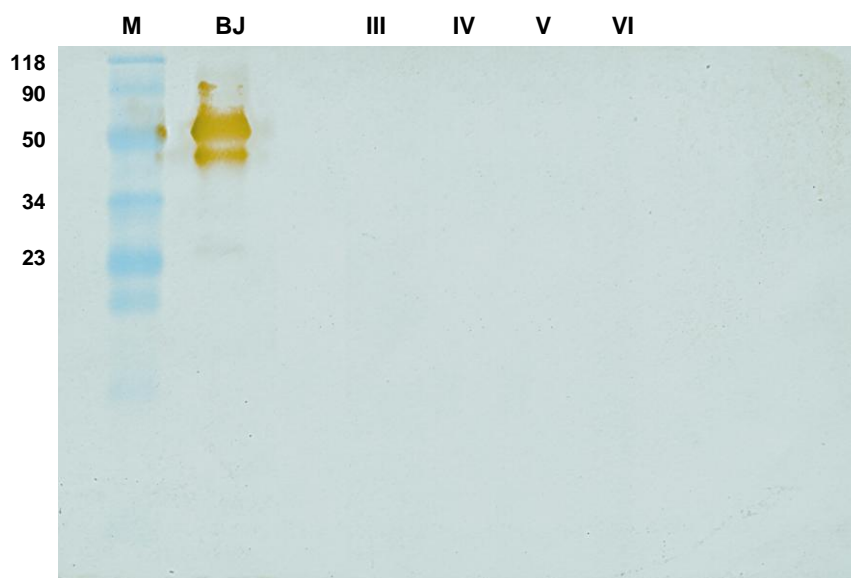


Figura 21- Western-Blot realizado com as frações citotóxicas III, IV, V e VI provenientes da cromatografia líquida de troca aniônica, onde (M) é o marcador de massa molecular e (BJ) é o veneno total da serpente *Bothrops Jararaca* que foi utilizado como controle positivo.

No ensaio de Western-Blot apenas o marcador de massa molecular e o controle positivo aparecem, nenhuma amostra analisada foi revelada, ou seja, o anticorpo anitjararagina não identificou proteínas da família das metaloproteinase.

4.6.2. Zimografia

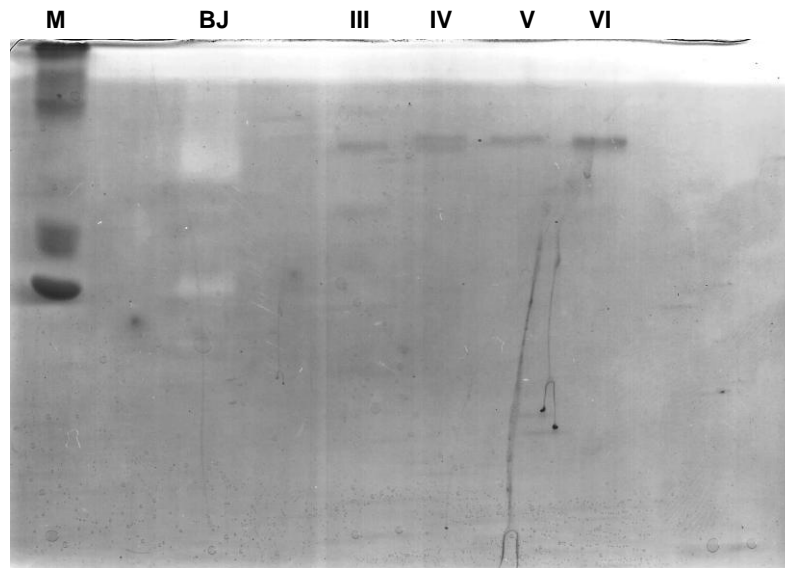


Figura 22- Ensaio de Zimografia utilizando concentração de gelatina a 8mg/mL em um gel de resolução a 13% de acrilamida. O primeiro poço é o marcador de massa molecular (M), o segundo (BJ) é o veneno total da serpente *Bothrops Jararaca* que foi utilizado como controle positivo.

No ensaio de zimografia apresentado na figura 22 não são observados nenhum alo claro contornando as bandas relativas às amostras III, IV, V e VI derivadas da primeira etapa de fracionamento por troca aniônica do veneno da serpente *Notechis ater niger*. Isso mostra que nenhum composto apresenta atividade gelatinolítica.

4.7. Fracionamento das frações III, IV, V E VI por cromatografia de exclusão molecular e subsequente eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

Com o objetivo de separar melhor os componentes encontrados nas frações do veneno da serpente *Notechis ater niger* que apresentaram citotoxicidade, optou-se por utilizar a técnica de cromatografia líquida por exclusão molecular.

4.7.1. Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração III obtida do veneno de *Notechis ater niger*:

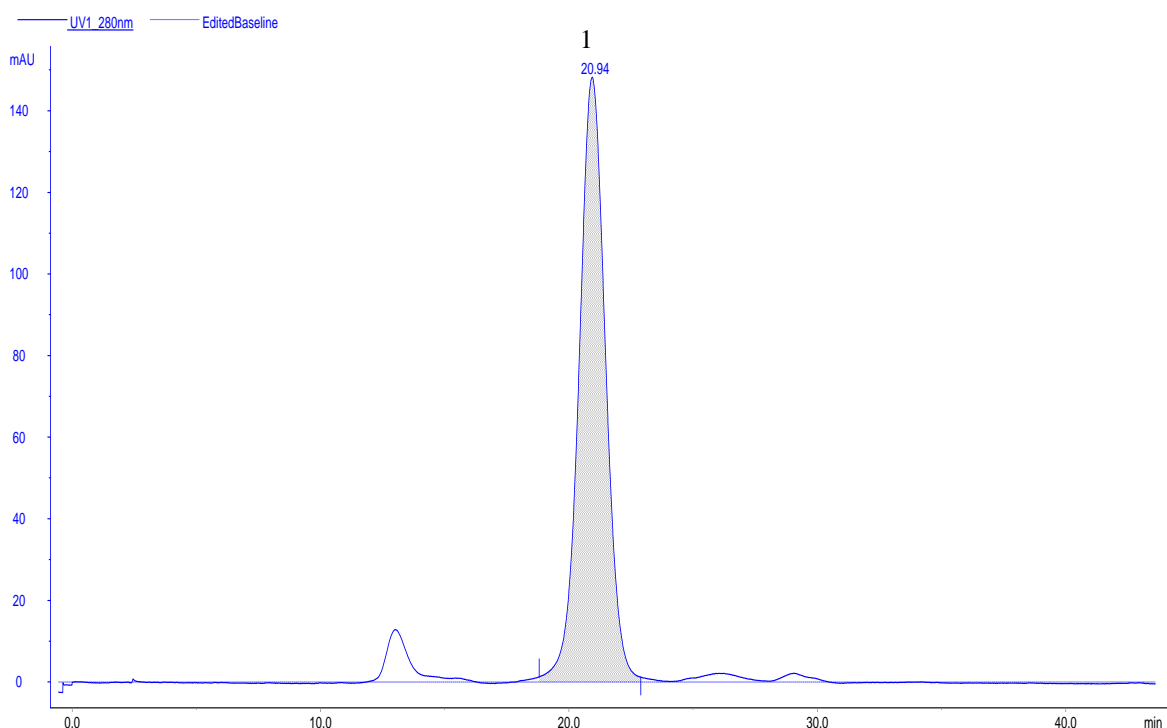


Figura 23- Perfil cromatográfico da Fração III obtida da troca iônica realizada com o veneno total de *N. ater niger* em coluna Superdex 75 10/300 GL equilibrada com Bicarbonato de amônio 100mM. A absorvância foi determinada em 280nm.

Na figura 23 apenas uma banda foi observada no comprimento de onda de 280nm com um tempo de retenção de aproximadamente 21 minutos.

4.7.2. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração III do veneno de *Notechis ater niger* obtida após fracionamento de exclusão molecular

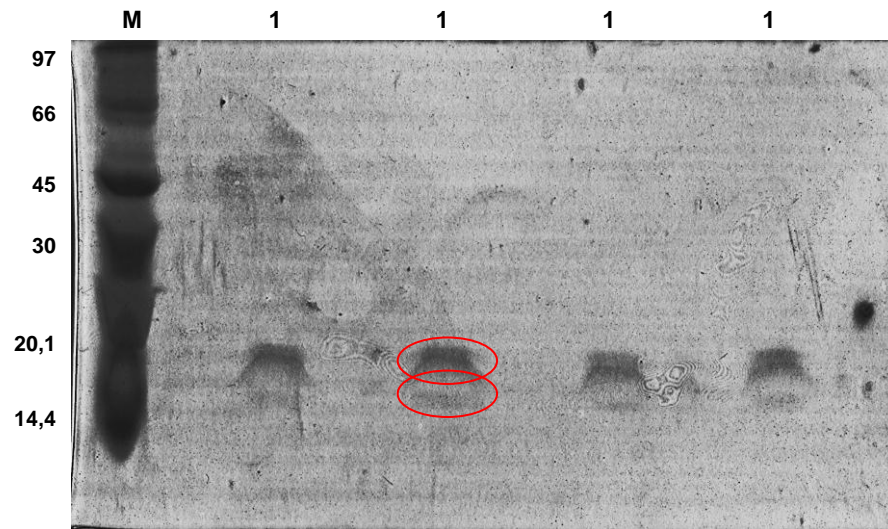


Figura 24 – SDS-PAGE a 12,5% realizado do pico 1 obtido no fracionamento da fração III proveniente da troca aniônica, onde o marcador de massa molecular é identificado como M e a fração como 1.

Na figura 24 pode-se observar que há duas bandas no pico 1 obtido da fração III da troca aniônica.

4.7.3. Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração IV obtida do veneno de *Notechis ater niger*:

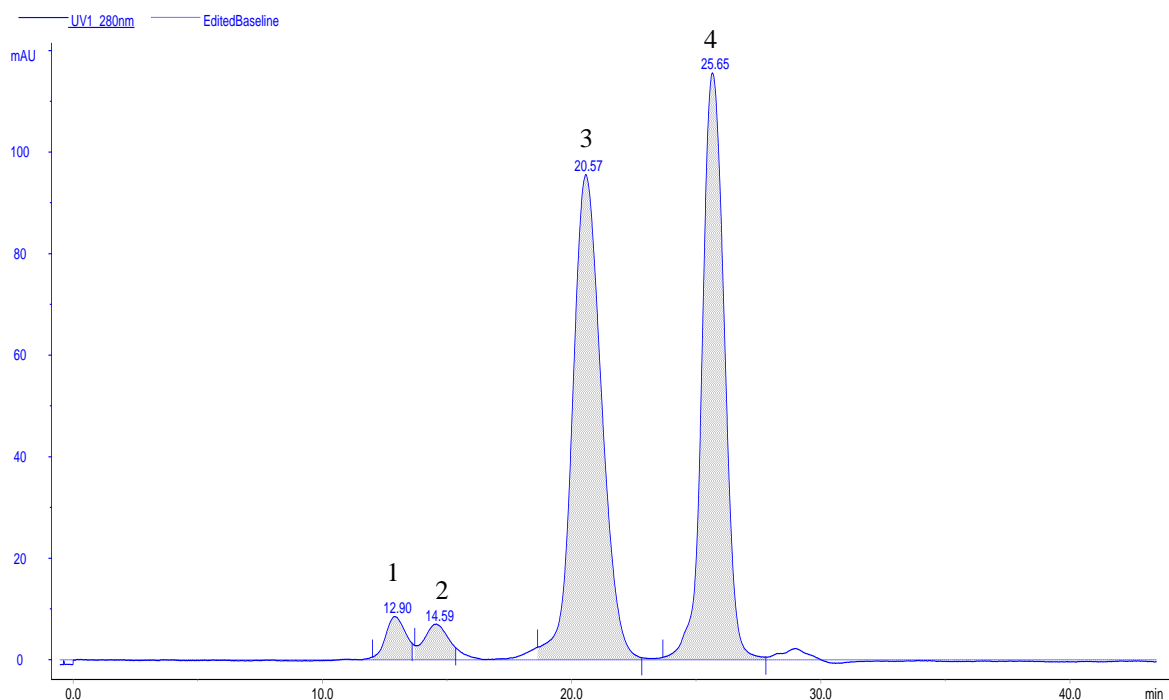


Figura 25- Perfil cromatográfico da Fração IV obtida da troca iônica realizada com o veneno total de *N. ater niger* em coluna Superdex 75 10/300 GL equilibrada com Bicarbonato de amônio 100mM. A absorvância foi determinada em 280nm.

Na figura 25 pode-se observar 4 picos na região de comprimento de onda de 280nm, onde os picos 3 e 4 apresentam uma área de banda maior dos que os primeiros picos, sendo que o pico 3 é o majoritário. Os tempos de retenção (em minutos) dos picos 1, 2, 3 e 4 foram 12,90; 14,59; 20,57 e 25,65, respectivamente.

4.7.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração IV do veneno de *Notechis ater niger* obtida após fracionamento de exclusão molecular

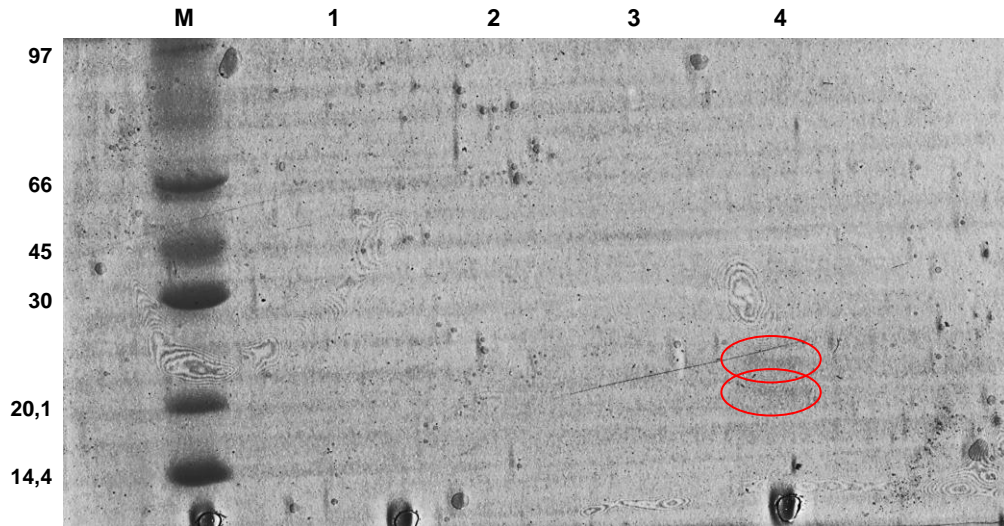


Figura 26 - SDS-PAGE a 12,5% realizado dos picos 1, 2, 3 e 4 obtidos no fracionamento da fração IV proveniente da troca aniônica, onde o marcador de massa molecular é identificado como M e as frações como 1, 2, 3 e 4.

Duas bandas de baixa intensidade são observadas no gel da figura 26, elas correspondem ao pico 4 obtido da fração IV da troca aniônica.

4.7.5. Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração V obtida do veneno de *Notechis ater niger*:

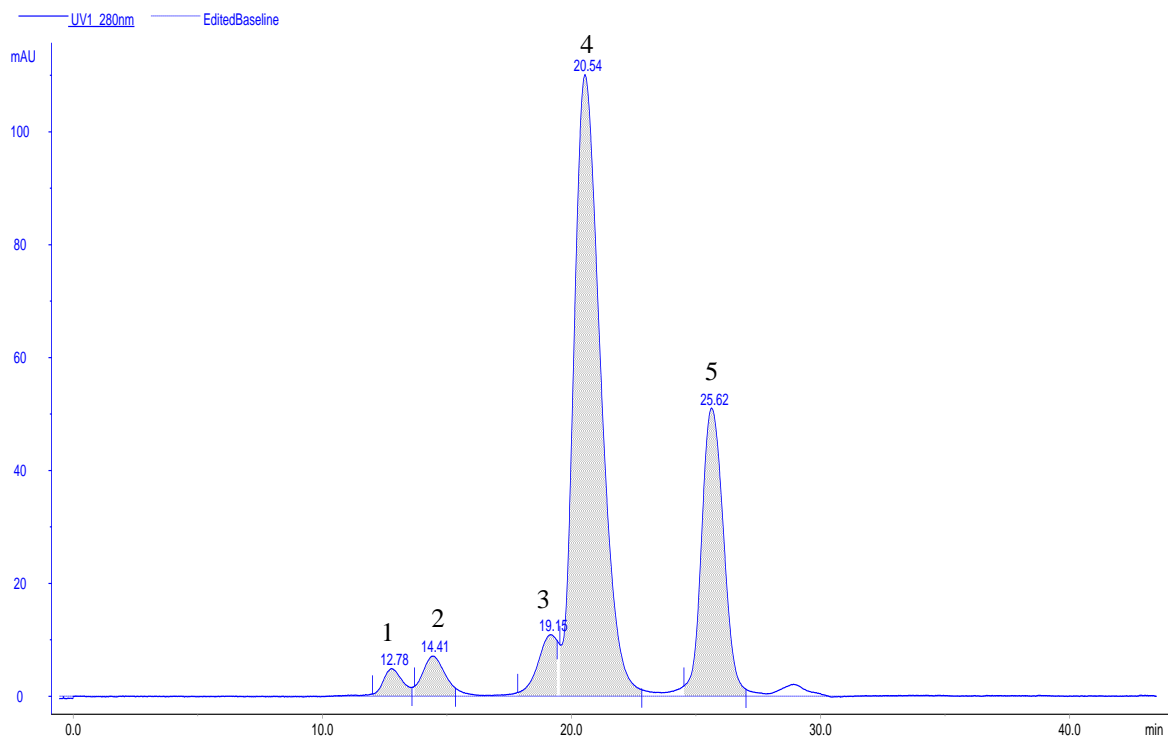


Figura 27- Perfil cromatográfico da Fração V obtida da troca iônica realizada com o veneno total de *N. ater niger* em coluna Superdex 75 10/300 GL equilibrada com Bicarbonato de amônio 100mM. A absorvância foi determinada em 280nm.

Na figura 27 foram observados 5 picos, o pico 3 está sobreposto ao 4, porém o cromatograma apresentou picos bem definidos com relação à separação e largura de banda. Os tempos de retenção (em minutos) dos picos 1, 2, 3, 4 e 5 foram 12,78; 14,41; 19,15; 20,54 e 25,62, respectivamente. O pico 4 é o majoritário, seguido pelo pico 5.

4.7.6. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração V do veneno de *Notechis ater niger* obtida após fracionamento de exclusão molecular

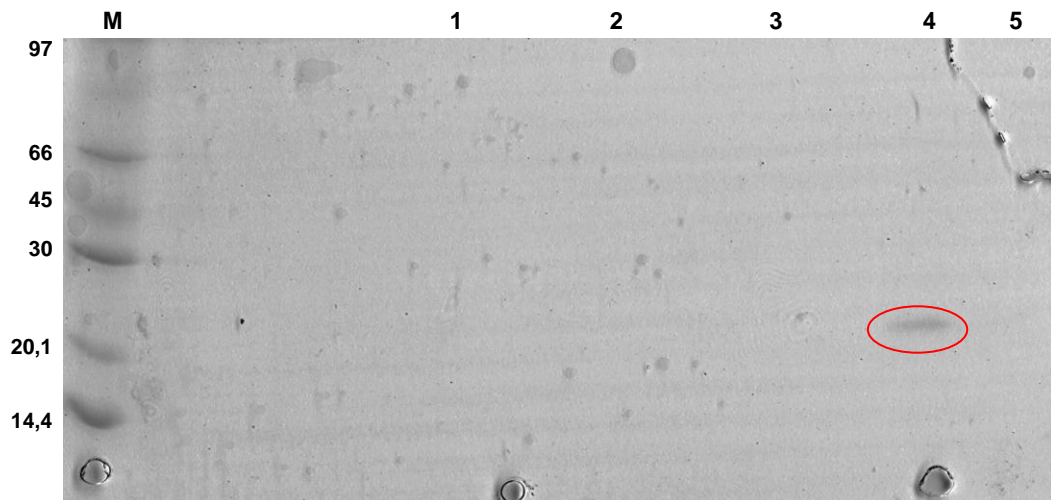


Figura 28 - SDS-PAGE a 12,5% realizado dos picos 1, 2, 3, 4 e 5 obtidos no fracionamento da fração IV proveniente da troca aniônica, onde o marcador de massa molecular é identificado como M e as frações como 1, 2, 3, 4 e 5.

Neste gel apresentado na figura 28 apenas o pico 4 é observado como uma única banda isolada.

4.7.7. Cromatografia líquida por exclusão molecular da Fração VI obtida do veneno de *Notechis ater niger*:

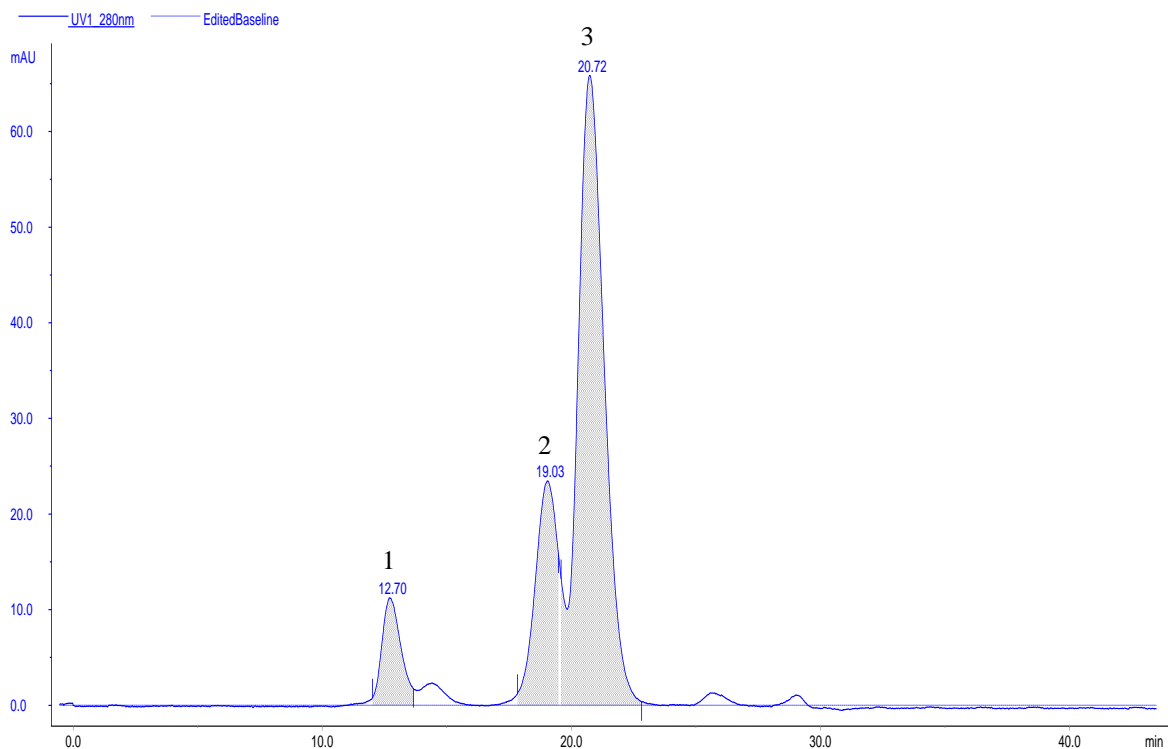


Figura 29- Perfil cromatográfico da Fração VI obtida da troca iônica realizada com o veneno total de *N. ater niger* em coluna Superdex 75 10/300 GL equilibrada com Bicarbonato de amônio 100mM. A absorvância foi determinada em 280nm (azul).

Na figura 29 apenas 3 picos eluíram da coluna de exclusão molecular. Os tempos de retenção (em minutos) dos picos 1, 2 e 3 foram 12,70; 19,03 e 20,72, respectivamente. O pico 3 é o majoritário, seguido pelos picos 2 e 1.

4.7.8. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE) da Fração VI do veneno de *Notechis ater niger* obtida após fracionamento de exclusão molecular

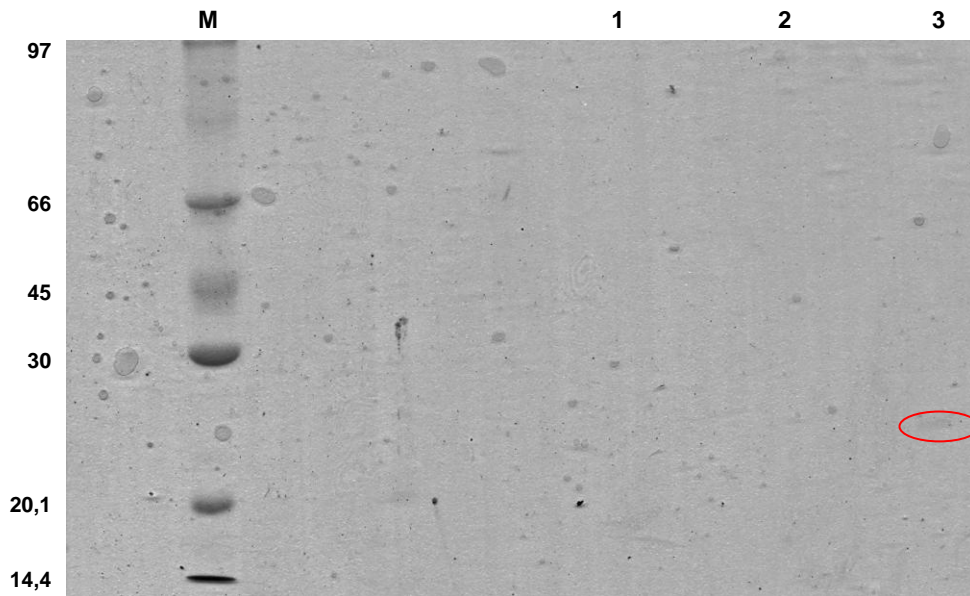


Figura 30 - SDS-PAGE a 12,5% realizado dos picos 1, 2 e 3 obtido no fracionamento da fração IV proveniente da troca aniônica, onde o marcador de massa molecular é identificado como M e as frações como 1, 2, e 3.

No gel realizado com as frações obtidas da fração VI não é possível observar bandas na maioria das frações aplicadas, apenas o pico 3 pode ser observado e com uma baixa intensidade.

5. DISCUSSÃO

Nos últimos anos, especial atenção tem sido dada ao desenvolvimento de novas drogas com atividade antitumoral. Dentre elas, estão substâncias de origem vegetal como a colchicina e também toxinas de origem animal, principalmente oriundas de venenos de serpentes (Jokhio e Ansari, 2005).

A utilização de venenos de serpentes para o tratamento de câncer em animais de laboratório foi relatada pela primeira vez por Calmette e colaboradores em 1933. Desde então, a busca por terapias mais eficientes contra o câncer utilizando toxinas de venenos de serpentes têm chamado à atenção dos pesquisadores devido ao grande potencial terapêutico que seus componentes bioativos apresentam (Lipps, 1999; Gomes *et al.*, 2010).

O primeiro estudo realizado com venenos de serpente em células tumorais *in vitro* utilizou a linhagem de células de melanoma murino B16-F10 e células de condrosarcoma. Chaim-Matyas e Ovadia (1987) avaliaram venenos de serpentes das famílias *Crotalidae*, *Viperidae* e *Elapidae* e mostraram que a atividade citotóxica dos venenos de *Elapidae* foi consideravelmente maior quando comparados aos venenos de *Viperidae* ou *Crotalidae*.

Portanto, em um primeiro momento foram selecionados 4 venenos de serpentes da família *Elapidae* (*Acanthophis antarcticus*, *Notechis ater niger*, *Notechis scutatus scutatus* e *Pseudonaja textilis*) e apenas 1 veneno de serpente da família *Viperidae* (*Agkistrodon bilineatus*). Lembrando que a escolha também levou em consideração a disponibilidade dos venenos no acervo do laboratório e que nenhum dos venenos selecionados fora avaliado anteriormente em relação à atividade antitumoral.

Nos venenos de serpentes podem ser encontradas proteínas básicas, neutras e ácidas, dessa forma, a opção de se estudar proteínas ácidas funciona como uma pré-seleção. Portanto, para uma etapa inicial de fracionamento dos venenos, foi realizada a cromatografia de troca aniônica, onde as frações das

amostras que são adsorvidas pela coluna cromatográfica vão conter proteínas carregadas negativamente, ou seja, proteínas de caráter ácido ($pI < 7,0$).

Como resultado dos fracionamentos, os venenos das serpentes *Acanthophis antarcticus*, *Notechis ater niger*, *Pseudonaja textilis*, *Agkistrodon bilineatus* e *Notechis scutatus scutatus* tiveram, respectivamente, 11,45%, 24,53%, 43,21%, 56,13% e 57,22% dos seus compostos adsorvidos pela coluna de troca aniônica.

Os cromatogramas dos venenos das serpentes *Notechis ater niger*, *Pseudonaja textilis*, e *Acanthophis antarcticus* apresentaram picos bem definidos das frações adsorvidas pela coluna. A boa resolução pode ser explicada pelo fato de que estes venenos tiveram menor porcentagem de componentes adsorvidos pela coluna.

O ensaio de SDS-PAGE permitiu avaliar melhor as frações obtidas por cromatografia demonstrando que, apesar da boa resolução de alguns cromatogramas, a maioria das frações coletadas de todos os venenos analisados não apresentaram proteínas totalmente isoladas.

Apesar do perfil cromatográfico do veneno da serpente *Pseudonaja textilis* (figuras 13 e 14) ter apresentado uma boa resolução, a cromatografia de troca aniônica não foi eficiente no seu fracionamento, tampouco no fracionamento do veneno de *Notechis scutatus scutatus*, o que foi observado por SDS-PAGE (figuras 9 e 10), dado o alto número de proteínas presentes em cada fração obtida. Entretanto, todas as frações coletadas foram submetidas aos ensaios de citotoxicidade em células tumorais e normais.

Além da resistência que os melanomas metastáticos apresentam frente às modalidades de terapia como quimio e radioterapia, um importante obstáculo a ser superado no tratamento dessa doença é conseguir eliminar por completo a população de células tumorais sem causar maiores danos às células normais adjacentes, tanto pela falta de especificidade e seletividade dos agentes terapêuticos quanto pelo stress celular que esses agentes proporcionam (Martí *et al.*, 2012). Portanto, o foco do ensaio de citotoxicidade foi avaliar a capacidade das frações de serem significativamente mais citotóxicas em células tumorais de melanoma B16-F10 do que em células normais de fibroblasto L929.

Dos cinco venenos utilizados, quatro deles apresentaram alguma fração com capacidade de inibir o crescimento das células tumorais, sem, contudo, apresentar toxicidade significativa para células normais ($P < 0,001$).

Apesar dos venenos analisados no presente trabalho ainda não terem sido avaliados para fins antitumorais, o veneno da serpente *N. ater niger* é o menos explorado de maneira geral. Este veneno foi um dos que apresentou uma das melhores resoluções na cromatografia líquida de troca aniônica, confirmado pelo ensaio de eletroforese por SDS-PAGE (figura 13) e apresentou citotoxicidade e especificidade para células tumorais em seis de suas frações analisadas ($P < 0,001$). São elas as frações I, II, III, IV, V e VI.

O veneno de *Notechis ater niger* foi então selecionado para dar continuidade na identificação de uma proteína de efeito antitumoral. As frações I e II apresentaram certa citotoxicidade nas células B16-F10, sendo que a segunda fração não apresentou citotoxicidade alguma nas células normais L929. Porém, para obter um maior efeito citotóxico nas células tumorais teríamos que aumentar a concentração da amostra, o que poderia causar morte das células normais L929.

No caso das frações III, IV, V e VI todas elas apresentaram alta citotoxicidade em células B16-F10 ($> 90\%$), sendo que quando comparadas às células L929, essa atividade caiu mais que a metade. Optou-se por selecionar para os demais ensaios apenas as frações III, IV, V e VI. Considerando-se que as concentrações dessas frações podem ser ajustadas para obter uma menor citotoxicidade em células normais, mantendo o efeito citotóxico em células tumorais.

As frações que apresentaram maior citotoxicidade (frações III, IV, V e VI) foram então submetidas aos ensaios de imunoblotting, capacidade gelatinolítica e cromatografia líquida de exclusão molecular. Estes ensaios foram realizados com a finalidade de avaliar se os componentes presentes nas frações selecionadas pertenciam a alguma classe de proteínas que já demonstrou potencial antitumoral na literatura.

Algumas LAAOs como a ACTX-6, ACTX-8 da serpente *Agkistrodon acutus* revelaram possuir alguma atividade antitumoral frente a células de carcinoma cervical, causando indução de apoptose em experimentos *in vitro* e *in*

vivo (Zhang e Wei, 2007; Zhang e Wu, 2008). Outro estudo realizado por Ahn e colaboradores (1997) analisou uma LAAO derivada do veneno da serpente *Ophiophagus hannah* (Li *et al.*, 1994) em células B16-F10, onde um dos mecanismos que contribuiu para tal citotoxicidade foi a diminuição da captação de timidina pelo DNA das células tumorais, impedindo a proliferação dessas células.

As frações III, IV, V e VI do veneno de *N. ater niger* apresentaram bandas mais intensas na região entre 24 e 11 kDa. No gel de SDS-PAGE não reduzido apresentado na figura 19 mostra que as bandas das 4 frações parecem compartilhar uma mesma massa molecular, não descartando-se a possibilidade de que sejam o mesmo composto ou isoformas de uma mesma classe de proteínas. Devido ao valor das massas moleculares obtidas pode-se descartar a existência de LAAOs nas frações citotóxicas, pois as proteínas dessa família apresentam massas moleculares mais elevadas (110 a 150 kDa) quando se encontram em condições não reduzidas.

Outra família de proteínas bem caracterizada e estudada é a das SVMPS. A jararagina é uma metaloproteinase tipo P-III de caráter hemorrágico derivada do veneno da serpente *Bothrops jararaca* que possui diversos estudos em relação aos seus efeitos em células tumorais. Corrêa e colaboradores (2002) estudaram seu efeito em células de melanoma maligno humano SK-Mel-28 e observaram que a jararagina causou alteração na morfologia, viabilidade, migração e invasão dessas células de uma forma dose e tempo-dependentes. Eles mostraram que essas alterações ocorreram uma vez que essa proteína apresenta um domínio disintegrina, o qual interage com receptores de integrinas na membrana celular prejudicando a adesão e a comunicação célula-célula e célula-matriz, que é fundamental para o crescimento, proliferação e manutenção das células tumorais, assim como no processo de metastatização.

A descoberta de potentes antagonistas que influenciam na agregação plaquetária celular e funções de adesão celular, mediada por integrinas, contribuiu significativamente para o desenvolvimento do estudo das interações de ligantes de integrina. Esses compostos, originalmente encontrados em venenos de serpentes, foram denominados de disintegrinas (Fidalgo *et al.*, 2005).

Algumas disintegrinas ofídicas já foram utilizadas em protocolos experimentais de inibição do crescimento e metastatização de células tumorais, como por exemplo, a contortrostatina, a eristostatina e a salmosina.

A contortrostatina (CN) é uma disintegrina homodimérica derivada do veneno da serpente *Agkistrodon contortrix contortrix* com uma massa molecular de 13kDa. A CN apresenta uma atividade anti-invasiva *in vitro*, sendo responsável pelo bloqueio dos receptores do tipo integrina $\alpha 5\beta 1$ em células de melanoma (M24met), impedindo sua metastatização (Swenson *et al.*, 2005). Estudos *in vivo* realizados com a CN frente a células de carcinoma metastático de mama da linhagem MDA-MB-435, implantadas em camundongos nude, revelaram um grande potencial antitumoral e anti-angiogênico (Swenson *et al.* 2005; Trikha *et al.*, 1994). A CN internalizada em lipossomos, aplicada *in vivo*, promoveu redução da densidade vascular e metástase de tumores mamários da linhagem MDA-MB-435 implantados em camundongos nude (Swenson *et al.*, 2004).

A eristostatina é um potente inibidor de agregação plaquetária em modelos de melanoma de murino e humano (McLane *et.al.*, 2001), e estudos realizados com a salmosina mostraram que essa disintegrina reduziu a metastatização e colonização de metástases pulmonares de células de melanoma murino B16-F10 de maneira dose-dependente (Corrêa *et al.*, 2002).

Já foi demonstrado que uma disintegrina encontrada no veneno de *Crotalus scutulatus scutulatus* denominada Mojastina-1, que possui 70 aa e uma massa molecular de 7kDa (Sanchez *et al.*, 2006) inibiu a agregação plaquetária no sangue humano mas não conseguiu impedir a adesão de células de carcinoma de bexiga T24 em fibronectinas.

Lucena e colaboradores (2011), utilizando peptídeos recombinantes da Mojastina-1, mostraram que um dos tipos (r-Mojastina-1) inibiu a colonização de células B16-F10 nos pulmões de camundongos e a adesão celular de células de melanoma SK-Mel-28, porém, não inibiu a adesão das células T24 em fibronectinas, conforme já relatado por Sanchez e colaboradores (2006). Outro tipo (r-Mojastina-GST) inibiu a adesão celular à fibronectina em ambas as linhagens, e os dois tipos inibiram a migração celular de SK-Mel-28.

Outra disintegrina recombinante, a Leucorogina (10,4kDa), derivada de uma metaloproteinase do tipo P II obtida do veneno da serpente *Bothrops*

leucurus apresentou inibição de agregação plaquetária induzida por colágeno e crescimento do tumor ascítico de Ehrlich. A Leucorogina também apresentou um grande potencial em inibir processos de vascularização (Higuchi *et al.*, 2011).

Os ensaios de Western-blot e zimografia realizados com as frações citotóxicas do veneno da serpente *Notechis ater niger* buscou identificar se algum dos componentes presentes nas frações poderia pertencer às proteínas da família das SVMPs.

Tanjoni e colaboradores (2003) mostraram que o anticorpo de coelho antijararagina é capaz de reconhecer metaloproteinases derivadas de venenos de serpentes da família das *Elapidae*. Portanto, o ensaio de western-blot avaliou a capacidade de reconhecimento do anticorpo frente às frações citotóxicas, e como controle positivo foi utilizado o veneno total da serpente *Bothrops jararaca*.

Ao observar as frações citotóxicas na figura 21, nota-se que nenhuma delas foi capaz de se ligar ao anticorpo utilizado, sugerindo que nenhum dos componentes pertence às proteínas do tipo metaloproteinase, e, uma vez que as disintegrinas são geralmente encontradas associadas às metaloproteinases, a possibilidade da presença deste tipo de molécula nas frações é menor.

O ensaio de zimografia visou verificar se alguma das frações do veneno de *Notechis ater niger* possuía atividade gelatinolítica, isso porque muitas proteínas das famílias de SVMPs e SVSPs que influenciam na coagulação sanguínea tem a capacidade de hidrolisar colágeno através do mesmo mecanismo no qual a gelatina é hidrolisada. Na figura 22, nenhuma das frações apresentou o halo branco que indica a hidrólise da gelatina, esse dado confirma a hipótese de que não há metaloproteinases nas frações citotóxicas, assim como a presença de proteínas do tipo serinoproteinases.

Ao realizar o segundo fracionamento por exclusão molecular das amostras citotóxicas do veneno da serpente *Notechis ater niger* obtidas primeiramente por cromatografia de troca aniônica foi possível observar que todos os cromatogramas apresentaram boa resolução e, com exceção da fração III, as demais frações, IV, V e VI apresentaram picos que correspondiam às bandas observadas no gel de eletroforese obtido da troca aniônica (figura 19). Pelo tempo de retenção dos picos com maior área (>20 minutos) pode se estimar que os componentes das frações não possuam valores altos de massa molecular, o que

foi confirmado em um segundo ensaio de eletroforese em gel de poliacrilamida, onde a fração de maior massa não possuía mais do que aproximadamente 24kDa.

Entre as famílias de proteínas com baixa massa molecular que já apresentaram potencial antitumoral estão as citotoxinas e as PLA₂.

As citotoxinas, também chamadas cardiotoxinas, constituem um grupo de polipeptídeos altamente básicos, encontrados em grandes quantidades em serpentes da família *Elapidae*. Elas são compostas por 60-70 resíduos de aminoácidos e apresentam diversos efeitos fisiológicos como modular a atividade de enzimas em membrana, despolarizar membranas excitadas, inibir agregação plaquetária, causar parada cardíaca, hemólise e citotoxicidade (Dufton & Hider, 1988; Yang *et al.*, 2005; Gomes *et al.*, 2010).

Essa classe de proteínas tem a habilidade de danificar uma ampla variedade de células, incluindo células tumorais (Debnath *et al.*, 2010). A cardiotoxina (CTX3) e cardiotoxina 4 (CTX4) isoladas do veneno da serpente *Naja naja atra* apresentaram um papel citotóxico em uma variedade de células tumorais, induzindo apoptose e inibindo crescimento celular (Yang *et al.*, 2005; Chen *et al.*, 2008; Tsai *et al.*, 2006). A toxina isolada do veneno da serpente *Daboia russelli russelli*, denominada drCT-I, também apresentou atividade antiproliferativa, citotóxica e apoptótica (Gomes *et al.*, 2007). Porém, essas proteínas apresentam caráter altamente básico, e como neste trabalho foram avaliadas apenas as frações com caráter ácido, a probabilidade de existir uma citotoxina dentre os componentes das frações é baixa.

A superfamília das PLA₂ consiste em aproximadamente 15 grupos, divididos em subgrupos onde todos apresentam diferenças quanto à estrutura e função. Entretanto, os quatro principais tipos ou classes de PLA₂ são as secretórias (sPLA₂), as citosólicas (cPLA₂), as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂) e as fosfolipases A₂ associadas a lipoproteínas (LpPLA₂) (Kang *et al.*, 2011).

As PLA₂ encontradas em venenos de serpente são secretórias (sPLA₂) e têm massas moleculares que variam entre 14 a 18 kDa, possuindo entre cinco e oito ligações dissulfídicas. São classificadas em dois grupos, I e II, devido à sua distinção baseada nas posições dos resíduos de cisteína em suas sequências (Murakami e Kudo, 2002; Murakami *et al.*, 2011).

As GI sPLA₂ são encontradas em venenos de *Elapidae*s e possuem sete ligações dissulfídicas com uma única ponte dissulfeto formada entre as cisteínas 11 e 72. As GII sPLA₂ são encontradas nos venenos de *Viperidae*s (Sajevic *et al.*, 2011). Este grupo pode também ser subdividido em pelo menos duas subclasses, as D49 PLA₂ que têm um resíduo Asp na posição 49 conferindo alta atividade catalítica da proteína sobre substratos de fosfolípídeos artificiais e K49 PLA₂, que têm um resíduo Lys na posição 49 conferindo ausência ou uma baixa atividade hidrolítica sobre substratos artificiais (Ownby *et al.*, 1999; Ohno *et al.*, 2003; Kini *et al.*, 2003).

Estruturalmente, as PLA₂ existem principalmente na forma de monômeros. No entanto, elas podem interagir com outras PLA₂ (ou moléculas PLA₂ símile) ou com outras proteínas formando complexos, por meio de interações covalentes ou não covalentes. Funcionalmente, estes complexos PLA₂ exibem neurotoxicidade pré-sináptica e exercem um importante papel no processo de envenenamento (Doley & Kini, 2009).

Complexos de PLA₂ ligados covalentemente foram encontrados apenas em serpentes da espécie *Bungarus*, eles apresentam uma conformação heterodimérica, e são denominadas β-bungarotoxinas (Doley & Kini, 2009).

Os complexos de PLA₂ ligados não covalentemente podem ter várias conformações estruturais. As homodiméricas como a Trimucrotoxina, uma neurotoxina pré-sináptica isolada do veneno da serpente *Trimeresurus mucrosquamatus* (Tsai *et al.*, 1995), as heterodiméricas como a vipoxina (*Vipera ammodytes meridionalis*) e viperotoxina F (*Vipera russelli formosensis*), as heterotriméricas como a taipoxina (*Oxyuranus scutellatus scutellatus*) e a paradoxina (*Parademansia microlepidotus*) e as heteropentaméricas como a textilotoxina (*Pseudonaja textilis*) (Montecucco *et al.* 2008; Doley e Kini, 2009).

Nos venenos de serpentes podem ser encontradas PLA₂ tanto básicas quanto ácidas, entretanto, a primeira apresenta uma toxicidade maior do que a segunda, principalmente com relação à neurotoxicidade e miotoxicidade. Apesar das PLA₂ de caráter ácido serem encontradas em menores quantidades e possuir concentração variável, as PLA₂ ácidas geralmente têm uma maior atividade catalítica sobre substratos sintéticos *in vitro* do que as PLA₂ de caráter básico (Fernández *et al.*, 2010).

Entre as neurotoxinas que apresentam atividade fosfolipásica, a crotoxina (CrTX) é uma das mais estudadas, incluindo estudos de atividade antitumoral. Esta proteína é uma β -neurotoxina heterodimérica derivada do veneno da serpente *Crotalus durissus terrificus* (Cascavel Brasileira) e corresponde de 40 a 60% do veneno total. Estruturalmente ela é formada por duas subunidades ligadas não-covalentemente, a subunidade A (~9.5KDa) que tem caráter ácido e não apresenta atividade enzimática e a subunidade B (~14,5KDa) com baixa toxicidade que tem caráter básico e consiste em uma PLA₂ símile formada por uma única cadeia de 122 aminoácidos “cross-linkados” por 7 pontes de sulfeto (Muller *et al.*, 2012). Apesar da subunidade que apresenta a atividade catalítica ser maior e ter caráter básico, o método de isolamento da proteína envolve cromatografia de exclusão molecular e troca aniônica.

Muitos estudos investigam o efeito neurotóxico da crotoxina com maior ênfase, porém, há estudos sobre os efeitos miotóxicos, nefrotóxicos e cardiotoxicos que ela exerce. Entretanto, outras formas de ação da toxina como efeitos imunomodulatórios, anti-inflamatórios, antitumorais, antimicrobianos e atividades analgésicas têm sido alvo de muitos estudos nos últimos anos (Sampaio *et al.*, 2010).

Corin e colaboradores (1993) avaliaram a citotoxicidade da crotoxina sobre células murinas tumorais de eritroleucemia e mostraram que o efeito antitumoral apresentado era independente da etapa do ciclo celular. Além disso, a especificidade da crotoxina demonstrou ser maior quando comparada a uma PLA₂ proveniente do veneno de *Crotalus atrox*.

Donato e colaboradores (1996) estudaram a crotoxina quanto a atividade antiproliferativa em células que expressam receptores de fator de crescimento endotelial (EGFr), e observaram diferentes níveis de expressão de EGFr. Neste estudo, ficou demonstrado que as células com maiores níveis de receptores EGF foram as mais afetadas pela toxina. Foi observado também um efeito tempo-dependente da toxina sobre as células.

Yan e colaboradores (2007) avaliaram o efeito que a crotoxina exerce sobre as células de carcinoma mamário humano MCF-7 e observaram a inibição da viabilidade celular e um efeito apoptótico por meio de mecanismos autofágicos.

Um estudo realizado por Paioli (2011) analisou a citotoxicidade da crotoxina comparando as mesmas linhagens de células tumorais B16-F10 e fibroblastos L929 e em um ensaio de IC50% foi demonstrado que as células tumorais eram 100 vezes mais sensíveis à crotoxina. Baseado nesses dados, os resultados de citotoxicidade das frações III, IV, V e VI do veneno de *Notechis ater niger* obtidos no presente trabalho se mostraram promissores devido à alta citotoxicidade e seletividade em células B16-F10.

Além da crotoxina, outros estudos realizados com PLA₂ de caráter ácido em células tumorais também mostraram o potencial antitumoral dessas moléculas (Basavarajappa e Gowda, 1992; Daniele *et al.*, 1997; Rudrammaji, e Gowda, 1998). Em 2007 Maity e colaboradores estudaram uma PLA₂ ácida denominada de RVV-7 purificada do veneno de *Daboia russelli russelli*. Ela foi testada em células da linhagem B16-F10 *in vitro* e *in vivo* e apresentou citotoxicidade nessas células, e também inibiu o crescimento tumoral em camundongos BLJ6.

Recentemente, Bazaia e colaboradores (2009) estudaram uma PLA₂ ácida derivada do veneno da serpente *Macrovipera lebetina* denominada MVL-PLA₂ e observaram que a toxina causou inibição de adesão celular e migração *in vitro* e que tal atividade se deu pela inibição de receptores de membrana do tipo integrinas específicos, sendo o primeiro estudo que revela que as integrinas constituem alvos específicos para o mecanismo de ação das PLA₂ em células tumorais.

Em um contexto geral, podemos observar que ainda há uma grande variedade de moléculas presentes nos venenos de serpentes que nunca foram estudados e que podem apresentar certo potencial antitumoral, visto que de todos os venenos analisados neste trabalho apenas um não apresentou citotoxicidade em suas frações. As frações do veneno de *Notechis ater niger* demonstraram ter maior seletividade frente às células tumorais B16-F10 e foi possível observar que com apenas duas etapas cromatográficas alguns dos compostos presentes na fração V e VI foram isolados (figuras 28 e 30).

Os venenos das serpentes analisados no presente trabalho nunca tiveram seus componentes avaliados no que concerne à atividade antitumoral, portanto, qualquer estudo realizado nesse âmbito é inédito. Por fim, considerando

todos os ensaios feitos com as frações III, IV, V e VI do veneno da serpente *Notechis ater niger* foram descartadas as possibilidades de que os componentes dessas frações fossem proteínas das classes das metalo e serinoproteinases, L-amino ácido oxidases, disintegrinas e cardiotoxinas. Os ensaios realizados neste estudo sugerem que as frações identificadas com ação antitumoral pertencem à família das fosfolipases (PLA₂).

6. CONCLUSÃO

- A cromatografia de troca aniônica apresentou boa resolução dos venenos das serpentes *Acanthophis antarcticus*, *Notechis ater niger* e *Pseudonaja textilis*.
- Na eletroforese em gel de poliacrilamida apenas os venenos das serpentes *Acanthophis antarcticus*, *Agkistrodon bilineatus* e *Notechis ater niger* apresentaram bandas isoladas nas frações III, I e X, respectivamente.
- Com exceção do veneno da serpente *Pseudonaja textilis*, os demais venenos apresentaram pelo menos uma fração com maior citotoxicidade em células tumorais B16-F10 do que em células normais de fibroblasto L929.
- As frações III, IV, V e VI do veneno da serpente *Notechis ater niger* apresentaram o maior potencial de citotoxicidade em células tumorais.
- Os ensaios de western blot utilizando o anticorpo monoclonal de coelho antijararagina e a zimografia realizados sugerem que os componentes com atividade antitumoral estudados não pertencem à classe das serino e metaloproteinases.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

AHN, M.Y.; LEE, B.M.; KIM, Y.S.; Characterization and Cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the Venom of King Cobra (*Ophiopkagus hannah*). **Int. J. Biochem. Cell Biol.**, Vol. 29(6), p. 911-919, 1997.

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.

AXELSON, H.; FREDLUND, E.; OVENBERGER, M.; LANDBERG, G.; PAHLMAN, S.; Hypoxia-induced dedifferentiation of tumor cells: A mechanism behind heterogeneity and aggressiveness of solid tumors. **Seminars in Cell & Developmental Biology**, Vol. 16, p. 554–563, 2005.

BASAVARAJAPPA, B. S.; GOWDA, T.V.; Comparative characterization of two toxic phospholipases A2 from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon**, Vol.30(10), p. 1227-1238, 1992.

BAZAA A., LUIS J.,SRAIRI-ABID N., KALLECH-ZIRI O., KESSENTINI-ZOUARI R., DEFILLES C., LISSITZKY J. C., EL AYEB M., MARRAKCHI N., MVL-PLA2, a phospholipase A2 from *Macrovipera lebetina transmediterranea* venom, inhibits tumor cells adhesion and migration. **Matrix Biology**, Vol. 28; p 188–193; 2009.

BIGNOLD, L.P.; Variation, “evolution”, immortality and genetic instabilities in tumour cells. **Cancer Letters**, Vol. 253, p. 155–169, 2007.

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

BURKE, J.E.; DENNIS, E.A.; Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, p. 237 – 242, 2009.

CAŁKOSIŃSKI, I.; SEWERYN, E.; ZASADOWSKI, A.; MAŁOLEPSZA-JARMOŁOWSKA, K.; DZIERZBA, K.; BRONOWICKA-SZYDEŁKO, A.; MIERZCHAŁA, M.; CEREMUGA, I.; ROSIŃCZUK-TONDERYS, J.; DOBRZYŃSKI, M.; GAMIAN, A.; The composition, biochemical properties and toxicity of snake venoms. **Postepy Hig Med Dosw**, Vol. 64, p. 262-272, 2010.

CALMETTE, A.; SAENZ, A.; COSTIL, L.; Effects du venim de cobra sur les greffes cancreuses et sur le cancer spontane (adenocarcinoma) de la souris. **C. R. Acad Sci**, Vol. 197, 1933.

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

CARVALHO PESSOA, E.; RODRIGUES, J.R.P.; MICHELIN, O.; VESPOLLI DE LUCA, H.; KAMIYA, C.P.; TRAIMAN, P.; UEMURA, G.; Avaliação da resposta à quimioterapia primária em amostra de mulheres brasileiras com tumores de mama localmente avançados. **Rev Bras Ginecol Obstet.**, Vol. 29(1), p. 18-26, 2007.

CHAIM-MATYAS, A.; OVADIA, M.; Cytotoxic Activity of Various Snake Venoms on Melanoma, B16-F10 and Chondrosarcoma. **Life Sciences**, Vol. 40, p. 1601-1607, 1987.

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

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

CORRÊA JR., M.C.; MARIA, D.A.; DA SILVA, A.M.M.; PIZZOCARO, K.F.; RUIZ, I.R.G.; Inhibition of melanoma cells tumorigenicity by the snake venom toxin jararhagin. **Toxicon**, Vol. 40, P. 739-748, 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**, Vol.17, p.589-592, 1991.

DANIELE, J.J.; BIANCO, I.D.; DELGADO, C.; BRIONES, C.D.; FIDELIO, G.D.; A new phospholipase A₂ isoform isolated from *Bothrops neuwiedii* (Yarará Chica) venom with novel kinetic and chromatographic properties. **Toxicon**, Vol. 35(8), p. 1205-1215, 1997.

DE MIRANDA, N.F.C.C.; BJORKMAN, A.; PAN-HAMMARSTROM, Q.; DNA repair: the link between primary immunodeficiency and cancer. **Ann. N.Y. Acad. Sci.**, Vol. 1246, p. 50–63, 2011.

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

DEBNATH, A.; SAHA, A.; GOMES, A.; BISWAS, S.; CHAKRABARTI, P.; GIRI, B.; BISWAS, A.K.; GUPTA, S.D.; GOMES, A.; A lethal cardiotoxic–cytotoxic protein from the Indian monocellate cobra (*Naja kaouthia*) venom. **Toxicon**, Vol. 56, p. 569-579, 2010.

DEL BRUTTO, O.H.; DEL BRUTTO V.J.; Neurological complications of venomous snake bites: a review. **Acta Neurol Scand**, Vol. 125, p. 363–372, 2012.

DENNIS, E.A.; Diversity of Group Types, Regulation, and Function of phospholipase A2. **The Journal of Biological Chemistry**, Vol. 269 (18), p. 13057-13060, 1994.

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**, Vol. 51, p. 1535-1543, 1996.

DOLEY, R.; KINI R.M.; Protein complexes in snake venom. **Cell Mol Life Sci**, Vol. 66, p. 2851–71, 2009

DU, X.A.; CLEMENTSON, K.J.; Snake venom L-amino acid oxidases. **Toxicon**, Vol. 40, p. 659-665, 2002.

DUFTON, M.J.; HIDER, R.C.; Structure and Pharmacology of Elapid Cytotoxins. **Pharmac. Ther.**, Vol. 36, pp. I - 40, 1988.

EL-REFAEL, M.F.; SARKAR, N.H.; Snake venom inhibits the growth of mouse mammary tumor cells *in vitro* and *in vivo*. **Toxicon**. Vol. 54, p. 33–41, 2009.

FERNÁNDEZ, J.; GUTIÉRREZ, J.M.; ANGULO, Y.; SANZ, L.; JUÁREZ, P.; CALVETE, J.J.; LOMONTE, B.; Isolation of an acidic phospholipase A2 from the venom of the snake *Bothrops asper* of Costa Rica: Biochemical and toxicological characterization. **Biochimie**, Vol. 92, p. 273 – 283, 2010.

FIDALGO, C.B.; COELHO, A.L.J.; GAMA, R.S.S.; NETO, E.H.; OLIVEIRA, A.M.; DE FREITAS, M.S.; Disintegrins: integrin selective ligands which activate integrin-coupled signaling and modulate leukocyte functions. **Brazilian Journal of Medical and Biological Research**, Review, Vol. 38, p. 1513-1520, 2005.

FRANKS, L.M.; TEICH N.M.; **Introdução à biologia celular e molecular do câncer**. Revisão e tradução BRENTANI M.M.; CHAMAS R.; Ed. Roca, São Paulo, 1990.

GESKIN, L.; BROWN, C.R.; KIRKWOOD, J.M.; Adjuvant Therapy of Melanoma. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, Vol 22, No 1, p. 55-67, 2003.

GOMES, A.; CHOUDHURY, S.R.; SAHA, A.; MISHRA, R.; GIRI, B.; BISWAS, A.K.; DEBNATH, A.; GOMES, A.; A heat stable protein toxin (drCT-I) from the Indian Viper (*Daboia russelli russelli*) venom having antiproliferative, cytotoxic and apoptotic activities. **Toxicon**, Vol. 49, p. 46–56, 2007.

GOMES, A.; BHATTACHARJEE, P.; MISHR, R.; BISWAS, A.K.; DASGUPTA S.C., GIRI B.; Anticancer potential of animal venoms and toxins. **Indian Journal of Experimental Biology**, Vol. 48, p. 93-103, 2010

GUTIÉRREZ, J.M.; RUCAVADO, A.; ESCALANTE, T.; DÍAZ, C.; Hemorrhage induced by snake venom metalloproteinases: biochemical and biophysical mechanisms involved in microvessel damage. **Toxicon**, Vol. 45, p. 997–1011, 2005.

HARWOOD, C.A.; SURENTERAN, T; MCGREGOR, J.M.; SPINK, P.J.; LEIGH, I.M.; BREUER, J.; PROBY, C.M.; Human Papillomavirus Infection and Non-Melanoma Skin Cancer in Immunosuppressed and Immunocompetent Individuals. **Journal of Medical Virology**, Vol. 61, p. 289–297, 2000.

HAASS, N.K.; HERLYN, M.; Normal Human Melanocyte Homeostasis as a Paradigm for Understanding Melanoma. **J. Investig. Dermatol. Symp. Proc.**, Vol. 10, p. 153–163, 2005.

HAASS, N.K.; SMALLEY, K.S.M.; HERLYN, M.; The role of altered cell–cell communication in melanoma progression. **Journal of Molecular Histology**, Vol. 35, p. 309–318, 2004.

HERLYN, M.; FUKUNAGA-KALABIS, M.; What Is a Good Model for Melanoma? **Journal of Investigative Dermatologist**, Vol. 130, p. 911–912, 2010.

HIGUCHI, D.A.; ALMEIDA, M.C.; BARROS, C.C.; SANCHEZ, E.F.; PESQUERO, P.R.; LANG, E.A.S.; SAMAAN, M.; ARAUJO, R.C.; PESQUERO, J.B.; PESQUERO, J.L.; Leucurogin, a new recombinant disintegrin cloned from *Bothrops leucurus* (white-tailed-jararaca) with potent activity upon platelet aggregation and tumor growth. **Toxicon**, Vol. 58, p. 123–129, 2011.

Instituto Nacional do Câncer (INCA) Disponível em <http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=322> 12 Out. 2011.

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

JURASZ, P.; ALONSO-ESCOLANO, D.; RADOMSKI, M.W.; Platelet–cancer interactions: mechanisms and pharmacology of tumour cell-induced platelet aggregation. **British Journal of Pharmacology**, Vol. 143, p. 819–826, 2004.

KAMIGUTI, A.S.; Platelets as targets of snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, Vol. 45, p. 1041–1049, 2005.

KANG, T.S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAMAKI, M.T.; SINHA, M.; KUMAR, R.P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R.K.; SINGH, T.P.; KINI, R.M.; Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**, Vol. 278, p. 4544-4576, 2011.

KARTHIKEYAN, R.; KARTHIGAYAN, M.; BALASUBRAMANIAN, S.; Antitumor effect of snake venom (*Hydrophis spiralis*) on Ehrlick ascites carcinoma bearing mice. **Int. J. Cancer Res.**, Vol. 3, p. 167–173, 2007.

KINI, R.M.; Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, Vol. 42, p. 827–840, 2003.

KINI, R.M.; Serine Proteases Affecting Blood Coagulation and Fibrinolysis from Snake Venoms. **Pathophysiol Haemost Thromb**, Vol. 34, p 200–204, 2005.

KLEIN, A.; CAPITANIO, J.S.; MARIA, D.A.; RUIZ, I.R.G.; Gene expression in SK-Mel-28 human melanoma cells treated with the snake venom jararhagin. **Toxicon**, Vol. 57, p. 1-8, 2011.

KOH, D.C.I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K.; Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cell. Mol. Life Sci.**, Vol. 63,p. 3030–3041, 2006.

KURUPPU, S.; SMITH, A.I.; ISBISTER, G.K.; HODGSON, W.C.; Neurotoxins From Australo-Papuan Elapids: A Biochemical and Pharmacological Perspective. **Critical Reviews in Toxicology**, Vol. 38, p. 73–86, 2008.

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

LARRÉCHÉ, S.; MION, G.; CLAPSON, P.; DEBIEN, B.; WYBRECHT, D.; GOYFFON, M.; Neurotoxins from snake venom. **Annales Françaises d'Anesthésie et de Réanimation**, Vol. 27, p. 310–316, 2008.

LEE, B.; MUKHI, N.; LIU, D.; Current management and novel agents for malignant melanoma. **Journal of Hematology & Oncology**, Vol. 5 (3), 2012.

LI, G.; SATYAMOORTHY, K.; HERLYN, M.; Dynamics of cell interactions and communications during melanoma development. **Crit. Rev Oral Biol Med.**, Vol. 13(1), p. 62-70, 2002.

LI, Z.Y.; YU, T.F.; LIAN, E.C.T.; Purification and Characterization of L-amino acid oxidase from King Cobra (*Ophiophagus hannah*) Venom and Its Effects on Human Platelet Aggregation. **Toxicon**, Vol. 32(11), p. 1349-1358, 1994.

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

LUCENA, S.; SANCHEZ, E.E.; PEREZ, J.C.; Anti-metastatic activity of the recombinant disintegrin, r-mojastin 1, from the Mohave rattlesnake. **Toxicon**, Vol. 57, p. 794–802, 2011.

MAITY, G.; MANDAL, S.; CHATTERJEE, A.; BHATTACHARYYA, D.; Purification and characterization of a low molecular weight multifunctional cytotoxic phospholipase A2 from Russell's viper venom. **Journal of Chromatography B**, Vol. 845, p. 232–243, 2007.

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**, Vol. 31(3-6), p. 177-82, 2001.

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

MARTÍ, R.M.; SOROLLA, A.; YERAMIAN, A.; Nuevas dianas terapéuticas en el melanoma. **Actas Dermosifiliogr**. Article in press, p. 1-12, 2012.

MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J.M.; LOMONTE, B.; Cellular pathology induced by snake venom phospholipase A2 myotoxins and neurotoxins: common aspects of their mechanisms of action. **Cell. Mol. Life Sci.**, Vol. 65, p. 2897–2912, 2008.

MORAES, M.C.S.; NETO, J.B.C.; MENCK, C.F.M.; DNA repair mechanisms protect our genome from carcinogenesis. **Frontiers in Bioscience**, Vol. 17, p. 1362-1388, 2012.

MURAKAMI, M.; KUDO, I.; Phospholipase A2. **J. Biochem.**, Vol.131, p. 285-292, 2002.

MURAKAMI, M.; TAKETOMI, Y.; SATO, H.; YAMAMOTO, K.; Secreted phospholipase A2 revisited. **J. Biochem.**, Vol. 150 (3), p. 233–255, 2011.

MURCHISON, A.P.; WALRATH, J.D.; WASHINGTON, C.V.; Non-surgical treatments of primary, non-melanoma eyelid malignancies: a review. **Clinical and Experimental Ophthalmology**, Vol. 39, p. 65–83, 2011.

MULLER, V.D.M.; RUSSO, R.R.; CINTRA, A.C.O.; SARTIM, M.A.; PAIVA, R.M.A.; FIGUEIREDO, L.T.M.; SAMPAIO, S.V.; AQUINO, V.H.; Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, Vol. 59, p. 507–515, 2012.

NAUMANN, G.B.; SILVA, L.S.; 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**, Vol. 1810, p. 683–694, 2011.

NINDL, I.; GOTTSCHLING, M.; STOCKFLETH, E.; Human papillomaviruses and non-melanoma skin cancer: Basic virology and clinical manifestations. **Disease Markers**, Vol. 23, p. 247–259, 2007.

OHNO, M.; CHIJIWA, T.; ODA-UEDA, N.; OGAWA, T.; HATTORI, S.; Molecular evolution of myotoxic phospholipases A2 from snake venom. **Toxicon**, Vol. 42, p. 841–854, 2003.

Organização Mundial da Saúde (OMS); **How common is skin cancer?** Disponível em <<http://www.who.int/uv/faq/skincancer/en/index1.html>> 26 Fev. 2012.

OWNBY, C.L.; de ARAUJO, H.S.S.; WHITE, S.P.; FLETCHER, J.E.; Lysine 49 phospholipase A2 proteins. **Toxicon**, Vol. 37, p. 411-445, 1999.

PAIOLI F.S.; Efeito citotóxico da crotoxina em células de melanoma murinho e fibroblastos. 2011. Tese (Mestrado), **Universidade de São Paulo, Instituto de Ciências Biomédicas**. São Paulo-SP

QIU-MIN, L.; REN, L.; YUN, Z.; Animal Toxins and Human Disease: from Single Component to Venomics, from Biochemical Characterization to Disease Mechanisms, from Crude Venom Utilization to Rational Drug Design. **Zoological Research**, Vol. 31(1), p. 2-16, 2010.

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

RIGEL, D.S.; Cutaneous ultraviolet exposure and its relationship to the development of skin cancer. **J Am Acad Dermatol**, Vol. 58, p.S129-S132, 2008.

RIKER, A.I.; SONDAK, V.K.; FISHMAN, M.; DAUD, A.; PILON-THOMAS, S.; Current immunotherapy of melanoma. **Clinical and Applied Immunology Reviews**, Vol. 5, p. 111–132, 2005.

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

RUDRAMMAJI, L.M.S.; GOWDA, T.V.; Purification and characterization of three acidic, cytotoxic phospholipases A2 from Indian cobra (*Naja naja naja*) venom. **Toxicon** Vol. 36, No. 6, pp. 921-932, 1998.

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIZAJ, I.; Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, Vol. 57, p. 627-645, 2011.

SALADI, R.N.; NEKTALOVA, T.; FOX, J.L.; Induction of skin carcinogenicity by alcohol and ultraviolet light. **Clinical and Experimental Dermatology**, Vol. 35, p. 7–11, 2009.

SAMEL, M.; VIJA, H.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E.; Isolation and characterization of an apoptotic and platelet aggregation inhibiting L-amino acid oxidase from *Vipera berus berus* (common viper) venom **Biochimica et Biophysica Acta** , Vol. 1764, p. 707–714, 2006.

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

SANCHEZ, E.E.; GALAN, J.A.; RUSSELL, W.K.; SOTO, J.G.; RUSSELL, D.H.; PEREZ, J.C.; Isolation and characterization of two disintegrins inhibiting ADP-induced human platelet aggregation from the venom of *Crotalus scutulatus scutulatus* (Mohave Rattlesnake). **Toxicol. Appl. Pharmacol.**, Vol. 212, p. 59–68, 2006.

SCHWARTZ, M.A.; MCROBERTS, K.; COYNER, M.; ANDARAWEWA, K.L.; FRIERSON JR., H.F.; SANDERS, J.M.; SWENSON, S.; MARKLAND, F.; CONAWAY, M.R.; THEODORESCU, D.; Integrin Agonists as Adjuvants in Chemotherapy for Melanoma. **Clin Cancer Res**, Vol. 14(19), p.6193, 2008.

SEFTOR, R.G.B.; SEFTOR, E.A.; HENDRIX, M.J.C.; Molecular role(s) for integrins in human melanoma invasion. **Cancer and Metastasis Reviews**, Vol. 18, p. 359–375, 1999.

SELISTRE-DE-ARAUJO, H.S.; PONTES, C.L.S.; MONTENEGRO, C.F.; MARTIN, A.C.B.M.; Snake Venom Disintegrins and Cell Migration. **Toxins**, Vol. 2, p. 2606-2621, 2010.

SEOANE, A.L.; TRAN, V.L.; SANCHEZ, E.E.; WHITE, S.A.; CHOI, J.L.; GAYTÁN, B.; CHAVEZ, N.; REYES, S.R.; RAMOS, C.J.; TRAN, L.H.; LUCENA, S.E.; SUGAREK, M.; PEREZ, J.C.; MANDAL, S.A.; GHORAB, S.; ACOSTA, A.R.; FUNG, B.K.; SOTO, J.G.; The mojastin mutant Moj-DM induces apoptosis of the human melanoma SK-Mel-28, but not the mutant Moj-NN nor the non-mutated recombinant Moj-WN. **Toxicon**, Vol. 56 , 391–401, (2010).

Skin Cancer Foundation – **Skin Cancer Information** Disponível em <http://www.skincancer.org/skin-cancer-information> 26 Fev. 2012

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

SWENSON, S.; COSTA, F.; MINEA, R.; SHERWIN, R.P.; ERNST, W.; FUJII, G.; YANG, D.; MARKLAND, F.S.; Intravenous liposomal delivery of the snake venom disintegrin contortrostatin limits breast cancer progression. **Mol Cancer Therapy**, Vol. 3(4), p. 499–511, 2004.

SWENSON, S.; COSTA, F.; ERNST, W.; FUJII, G.; MARKLAND, F.S.; Contortrostatin, a Snake Venom Disintegrin with Anti-Angiogenic and Anti-Tumor Activity. **Pathophysiol Haemost Thromb**, Vol. 34, p. 169–176, 2005.

TAKEDA, S.; TAKEYA, H.; IWANAGA, S.; Snake venom metalloproteinases: Structure, function and relevance to the mammalian ADAM/ADAMTS family proteins. **Biochimica et Biophysica Acta**, Vol. 1824, p. 164–176, 2012.

TANJONI, I.; BUTERA, D.; SPENCER, P.J.; TAKEHARA, H.A.; FERNANDES, I.; MOURA-DA-SILVA, A.M.; Phylogenetic conservation of a snake venom metalloproteinase epitope recognized by a monoclonal antibody that neutralizes hemorrhagic activity. **Toxicon**, Vol. 42, p. 809-816, 2003.

TANJONI, I.; WEINLICH, R.; DELLA-CASA, M.S.; CLISSA, P.B.; SALDANHA-GAMA, R.F.; FREITAS, M.S.; BARJA-FIDALGO, C.; 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**, Vol. 10, p. 851–861, 2005.

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**, Vol 10 (2), 2008.

TRIKHA, M.; DE CLERCK Y.A.; MARKLAND F.S.; Contortrostatin, a snake venom disintegrin, inhibits beta 1 integrin-mediated human metastatic melanoma cell adhesion and blocks experimental metastasis. **Cancer Res**, Vol. 54, p. 4993–4998, 1994

TSAI, IH.; ;LU, PJ.; WANG, YM.; HO, CL.; LIAW, LL.; Molecular cloning and characterization of a neurotoxic phospholipase A2 from the venom of Taiwan habu (*Trimeresurus mucrosquamatus*). **Biochem J**, Vol. 311(Pt 3), p. 895–900, 1995.

TSAI, CH.; YANG, SH.; CHIEN, CM.; LU, MC.; LO, CS.; LIN, YH.; HU, XW.; LIN, SR.; Mechanisms of cardiotoxin III-induced apoptosis in human colorectal cancer Colo205 cells. **Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology**, Vol. 33, p. 177-182, 2006.

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.

TUCKER, G.C.; Integrins: Molecular Targets in Cancer Therapy. **Current Oncology Reports**, Vol. 8, p. 96–103, 2006.

VILLARES, G.J.; ZIGLER, M.; BAR-ELI, M.; The Emerging Role of the Thrombin Receptor (PAR-1) in Melanoma Metastasis - a Possible Therapeutic Target, **Oncotarget**, Vol. 2, p. 8 – 17, 2011.

WARD, L.S.; Entendendo o Processo Molecular da Tumorigênese. **Arq Bras Endocrinol Metab**, Vol. 46 (4), 2002.

YAN, C.H.; YANG, Y.P.; QIN, Z.H.; GU, Z.L.; REID, P.; LIANG, Z.Q.; Autophagy is involved in cytotoxic effects of crotoxin in human breast cancer cell line MCF-7 cells. **Acta Pharmacol Sinica**. Vol. 28, p. 540-558, 2007.

YANG, SH.; LU, MC.; CHIEN, CM.; TSAI, CH.; LU, YJ.; HOUR, TC.; LIN, SR.; Induction of apoptosis in human leukemia K562 cells by cardiotoxin III. **Life Sciences**, Vol. 76, p. 2513-2522, 2005.

ZHANG, L.; WEI, L.J.; ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. **Life Sciences**, Vol. 80, p. 1189–1197, 2007.

ZHANG, L.; WU, W.T.; Isolation and characterization of ACTX-6: a cytotoxic L-amino acid oxidase from *Agkistrodon acutus* snake venom, **Natural Product Research:Formerly Natural Product Letters**, Vol. 22(6), p. 554-563, 2008.