

UNIVERSIDADE FEDERAL DE RONDÔNIA-UNIR  
NÚCLEO DE SAÚDE-DEPARTAMENTO DE MEDICINA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOLOGIA EXPERIMENTAL

JORGE JAVIER ALFONSO RUIZ DÍAZ

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA  
BmatTX-IV, UMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> BÁSICA DO VENENO DE *Bothrops*  
*mattogrossensis* DO PARAGUAI

PORTO VELHO-RO  
2015

JORGE JAVIER ALFONSO RUIZ DÍAZ

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA  
BmatTX-IV, UMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> BÁSICA DO VENENO DE *Bothrops*  
*mattogrossensis* DO PARAGUAI

Dissertação apresentada à Universidade Federal De  
Rondônia, como requisito para obtenção do título de  
Mestre em Biologia Experimental no Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Experimental

**Área de Concentração:** Bioprospecção e caracterização  
de moléculas da biodiversidade amazônica úteis à saúde  
humana; Nanotecnologia aplicada às doenças tropicais

**Orientador:** Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

**Co-Orientador:** María Celeste Vega

PORTO VELHO-RO  
2015

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Experimental do Núcleo de Saúde da Universidade Federal de Rondônia para obtenção do título de Mestre.

CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA  
BmatTX-IV, UMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> BÁSICA DO VENENO DE *Bothrops*  
*mattogrossensis* DO PARAGUAI

Defesa Pública realizada em **25** de setembro de 2015

### **Membros Titulares**

### **BANCA EXAMINADORA**

---

Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon  
(Presidente - Orientador - FIOCRUZ-RO)

---

Prof. Dr. Anderson Makoto Kayano  
(Membro Titular Externo)

---

Prof. Dr. Christian Collins Kuehn  
(Membro Titular - UNIR / DEPEMED)

**FICHA CATALOGRÁFICA**  
**BIBLIOTECA PROF. ROBERTO DUARTE PIRES**

Díaz, Jorge Javier Alfonso Ruiz.

D277c

Caracterização físico-química e atividade antiparasitária da BmatTX-IV, uma fosfolipase A2 básica do veneno de *Bothrops mattogrossensis* do Paraguai. / Jorge Javier Alfonso Ruiz Díaz, Porto Velho, 2015.

76f.; il.

Orientador: Prof. Dr. Leonardo de Azevedo Calderon

Dissertação (Mestrado em Biologia Experimental) – Fundação Universidade Federal de Rondônia, Porto Velho, 2015.

1. Fosfolipase A2 Lys49. 2. Atividade antiparasitária. 3. *Trypanosoma cruzi*. I. Fundação Universidade Federal de Rondônia. II. Título.

CDU: 616.937

**Bibliotecário responsável: Luã Silva Mendonça- CRB11/905**

## AGRADECIMENTOS

*Em primeiro lugar, agradeço a minha família: meus pais, meus irmãos, minhas sobrinhas e a Ana...por tudo, pela compreensão e paciência neste tempo, e pela confiança que sempre tiveram em mim...*

*Aos membros e colegas da equipe do Laboratório CEDIC, pela oportunidade de iniciar meu caminho no mundo da Ciência e da pesquisa;*

*Às Dras. Antonieta, Celeste e Miriam, pela amizade, orientações e conselhos nos momentos difíceis;*

*Ao Professor Leonardo Calderon, pela oportunidade de conhecer o CEBio e pela orientação e sugestões neste trabalho;*

*Ao professor Andreimar Soares, pela ajuda, conselhos e sugestões;*

*Aos membros do grupo CEBio, pela ajuda e amizade desde o primeiro momento que cheguei no Laboratório;*

*Aos colegas de Mestrado da Turma 2014;*

*Ao Programa de Incentivo al Investigador (PRONII), CONACYT, do Paraguai;*

*Aos órgãos de fomento no Paraguai ITAIPU BINACIONAL e FOCEM;*

*Aos órgãos de fomento no Brasil: CAPES, CNPq e FINEP*

*"Em um lugar escuro nos encontramos, e um pouco mais de conhecimento ilumina nosso caminho"*

Mestre Yoda

## RESUMO

**Jorge Javier Alfonso Ruiz Díaz.** CARACTERIZAÇÃO FÍSICO-QUÍMICA E ATIVIDADE ANTIPARASITÁRIA DA BmatTX-IV, UMA FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> BÁSICA DO VENENO DE *Bothrops matogrossensis* DO PARAGUAI

As serpentes da família Viperidae possuem glândulas salivares especializadas produtoras de uma mistura diversificada de proteínas com grande variedade de efeitos farmacológicos. A caracterização dos componentes bioativos destas secreções representam uma ferramenta importante para a melhor compreensão desses efeitos nas diversas manifestações clínicas do envenenamento e potenciais aplicações biotecnológicas. Este trabalho tem como objetivo purificar uma fosfolipase básica do veneno de *Bothrops matogrossensis* provenientes do Paraguai (BmatTX-IV), realizar sua caracterização físico-química, e avaliar sua atividade antiparasitária contra *Leishmania infantum* e *Trypanosoma cruzi*, assim como seu potencial citotóxico em fibroblastos murinos. A BmatTX-IV foi isolada em alto grau de pureza mediante uma cromatografia de troca catiônica (CM-Sepharose) seguida por uma cromatografia de fase reversa (C18). A análise por espectrometria de massa MALDI-TOF e SDS-PAGE 2D demonstraram uma proteína com valor de m/z de 13.555,82 e pI de 9,3. Posteriormente, mediante sequenciamento, foram obtidos 81 resíduos de aminoácidos apresentando um resíduo de Lisina na posição 49, característico ao grupo das fosfolipases enzimaticamente inativas (Lys49). Adicionalmente, o alinhamento múltiplo de sequência revelou alto grau de similaridade com outras fosfolipases deste grupo. O veneno revelou alta atividade antiparasitária *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*, assim como contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, apresentando inibição superior a 90% nas maiores concentrações testadas. Por outro lado, a BmatTX-IV foi capaz de inibir o crescimento de *L. infantum* e *T. cruzi* em aproximadamente 40% na concentração de 100 µg/mL, sugerindo que outras moléculas presentes no veneno podem estar atuando em sinergia com as fosfolipases. Finalmente, foram desenvolvidos testes de citotoxicidade do veneno e da BmatTX-IV contra fibroblastos murinos, o que demonstrou alta citotoxicidade do veneno, enquanto que a BmatTX-IV apresentou 40% nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, determinando que nos modelos testados não há seletividade do veneno e da toxina em relação a sua atividade tóxica.

**Palavras chave:** Fosfolipase A<sub>2</sub> Lys49, atividade antiparasitária, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, citotoxicidade.

## ABSTRACT

**Jorge Javier Alfonso Ruiz Díaz.** PHYSICAL-CHEMICAL CHARACTERIZATION AND ANTIPARASITIC ACTIVITY OF BmatTX-IV, A BASIC PHOSPHOLIPASE A<sub>2</sub> FROM THE VENOM OF *Bothrops mattogrossensis* FROM PARAGUAY

Snakes from the Viperidae family have specialized salivary glands that produce a diverse mixture of proteins with a great variety of pharmacological effects. The characterization of the bioactive components of these secretions are an important tool for better understanding these effects in the various clinical manifestations of envenoming and potential biotechnological applications. This paper aims to purify a basic phospholipase from the venom of *Bothrops mattogrossensis* from Paraguay (BmatTX-IV), perform its physicochemical characterization and evaluate its antiparasitic activity against *Leishmania infantum* and *Trypanosoma cruzi*. BmatTX-IV was isolated with a high degree of purity through a cation exchange chromatography (CM-Sepharose) followed by reverse phase chromatography (C18). Analysis by MALDI-TOF mass spectrometry and 2D SDS-PAGE showed a protein with an m/z value of 13555.82 and pI of 9.3. Subsequently, upon sequencing, 81 amino acid residues were obtained presenting a lysine residue at position 49, characteristic to the group of enzymatically inactive phospholipases (Lys49). Additionally, the multiple sequence alignment revealed a high degree of similarity with phospholipases of this group. The venom showed high antiparasitic activity *in vitro* against promastigotes of *Leishmania infantum* and against epimastigote forms of *Trypanosoma cruzi*, showing inhibition superior to 90% at the highest concentrations tested. On the other hand, BmatTX-IV was able to inhibit the growth of *L. infantum* and *Trypanosoma cruzi* by approximately 40% at a concentration of 100 µg/mL, suggesting that other molecules present in the venom may be acting in synergy with phospholipases. Finally cytotoxicity tests were developed using the venom and BmatTX-IV against murine fibroblasts, in which the venom showed high cytotoxicity, while BmatTX-VI showed 40% at concentrations of 100 and 50 µg/mL, determining that in the tested models there is not selectivity of the venom and toxin regarding their toxic activity.

**Keywords:** Phospholipase, PLA<sub>2</sub> Lys49 antiparasitic activity, *Trypanosoma cruzi*, *Leishmania infantum*, citotoxicity.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Ecorregiões do Paraguai.....	14
Figura 2: <i>B. matogrossensis</i> e distribuição.....	16
Figura 3: Composição química do veneno das serpentes .....	18
Figura 4: Sítios de hidrólises dos vários tipos de fosfolipases .....	19
Figura 5: Hidrólise de fosfolipídio por PLA <sub>2</sub> .....	20
Figura 6: Comparação das estruturas tridimensionais das PLA <sub>2</sub> dos grupos I e II .....	21
Figura 7: Representação do sitio de ligação de Ca <sup>+2</sup> de uma PLA <sub>2</sub> Asp49 e da região análoga em uma PLA <sub>2</sub> Lys49 .....	22
Figura 8: Perfil cromatográfico do veneno de <i>B. matogrossensis</i> em Cromatografia de Troca Catiônica.....	38
Figura 9: Perfil eletroforetico das frações provenientes da Cromatografia de Troca Catiônica .....	39
Figura 10: Perfil cromatográfico da Fração 7 submetida a cromatografia de fase reversa .....	40
Figura 11: Perfil cromatográfico da fração 7 recromatografada .....	41
Figura 12: Perfil eletroforetico da proteína isolada .....	42
Figura 13: Eletroforese Bi-idimensional .....	42
Figura 15: Alinhamento múltiplo da sequência de resíduos de aminoácidos da BmatTX-IV com sequencias de PLA <sub>2</sub> s Lys 49 isoladas de <i>B. matogrossensis</i> .....	44
Figura 17: Atividade leishmanicida <i>in vitro</i> .....	47
Figura 18: Atividade tripanocida <i>in vitro</i> .....	48
Figura 19: Citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	49

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Espécies de serpentes registradas no Paraguai .....	15
Tabela 2: Porcentagem de similaridade da sequência de resíduos de aminoácidos da BmatTX-IV com sequências de PLA <sub>2</sub> s Lys49 já caracterizadas .....	45
Tabela 3: Fosfolipases A <sub>2</sub> básicas isoladas de distintas espécies de serpentes com suas respectivas massas moleculares e <i>pI</i> .....	53

## LISTA DE ABREVIATURAS

- 2D-SDS-PAGE: Eletroforese Bi-dimensional
- 4N3OBA: 4-nitro-3-(octanoiloxi) benzoico
- ACN: Acetonitrila
- AMBIC: Bicarbonato de Amônio
- BbTX-II: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. brazili*
- BmatTX-I: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. mattogrossensis*
- BmatTX-II: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. mattogrossensis*
- BmatTX-III: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Asp49 isolada do veneno de *B. mattogrossensis*
- BmatTX-IV: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. mattogrossensis*
- BnSP-7: Fosfolipase básica Lys49 isolada do veneno de *B. pauloensis*
- BthTX-I: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. jararacussu*
- CEBio: Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde
- CEDIC: *Centro para el Desarrollo de la Investigación Científica*
- CPRG: *Chlorophenol Red-β- D -galactoside*
- CRISP: Proteínas secretoras ricas em cisteína
- FDA: *Food and Drug Administration*
- HPLC: *High Performance Liquid Chromatography*
- LAAO: L-aminoácido oxidase
- LIT: *Liver Infusion Tryptose*
- MALDI-TOF: *Matrix-assisted laser desorption ionization-Time of Flight*
- MjTX-I: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. moojeni*
- MjTX-II: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. moojeni*
- MTX-1: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Asp49 isolada do veneno de *B. asper*
- MTX-I: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. brazili*
- MTX-II: Fosfolipase A<sub>2</sub> básica Lys49 isolada do veneno de *B. brazili*
- pI: Ponto isoelétrico
- PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida
- SDS: Dodecil Sulfato de Sódio

SFB: Soro Fetal Bovino

TFA: Ácido trifluoracético

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	14
1.1	Paraguai e Biodiversidade.....	14
1.2	Distribuição de serpentes e acidentes ofídicos no Paraguai.....	15
1.3	As serpentes do complexo <i>neuwiedii</i> e a <i>Bothrops mattogrossensis</i> .....	15
1.4	Veneno de serpentes e composição química.....	16
1.5	Fosfolipases A <sub>2</sub> .....	19
1.6	Relevância dos estudos de caracterização do veneno de serpentes .....	24
1.7	Toxinas e potencial aplicação em doenças negligenciadas.....	25
1.7.1	Doença de Chagas .....	27
1.7.2	Leishmaniose .....	28
2	OBJETIVOS.....	30
2.1	Objetivo Geral.....	30
2.2	Objetivos específicos .....	30
3	MATERIAIS E MÉTODOS.....	31
3.1	Obtenção de veneno de <i>B. mattogrossensis</i> .....	31
3.2	Isolamento e caracterização físico-química da PLA <sub>2</sub> básica do veneno de <i>B. mattogrossensis</i> .....	31
3.2.1	Cromatografia de Troca catiônica e de Fase Reversa.....	31
3.2.2	Eletroforese em gel de Poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio.....	32
3.2.3	Confirmação de massa molecular por espectrometria de massa .....	32
3.2.4	Determinação de Ponto Isoelétrico da PLA <sub>2</sub> isolada em SDS-PAGE Bidimensional (2D) .....	33
3.3	Caracterização estrutural parcial.....	34
3.3.1	Sequenciamento de resíduos de aminoácidos por degradação química de Edman da PLA <sub>2</sub> isolada .....	34
3.3.2	Sequenciamento “ <i>de novo</i> ” .....	34
3.3.3	Análise de similaridade da sequência primária .....	34
3.4	Caracterização Biológica .....	35
3.4.1	Avaliação de atividade antiparasitária <i>in vitro</i> contra formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> (MCAN/ES/92/BCN28) .....	35
3.4.2	Avaliação de atividade antiparasitária <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas de <i>Trypanosoma cruzi</i> CL Clone B5 .....	35
3.4.3	Avaliação de citotoxicidade <i>in vitro</i> em fibroblastos NCTC 929 .....	36
3.5	Análise estatística.....	36

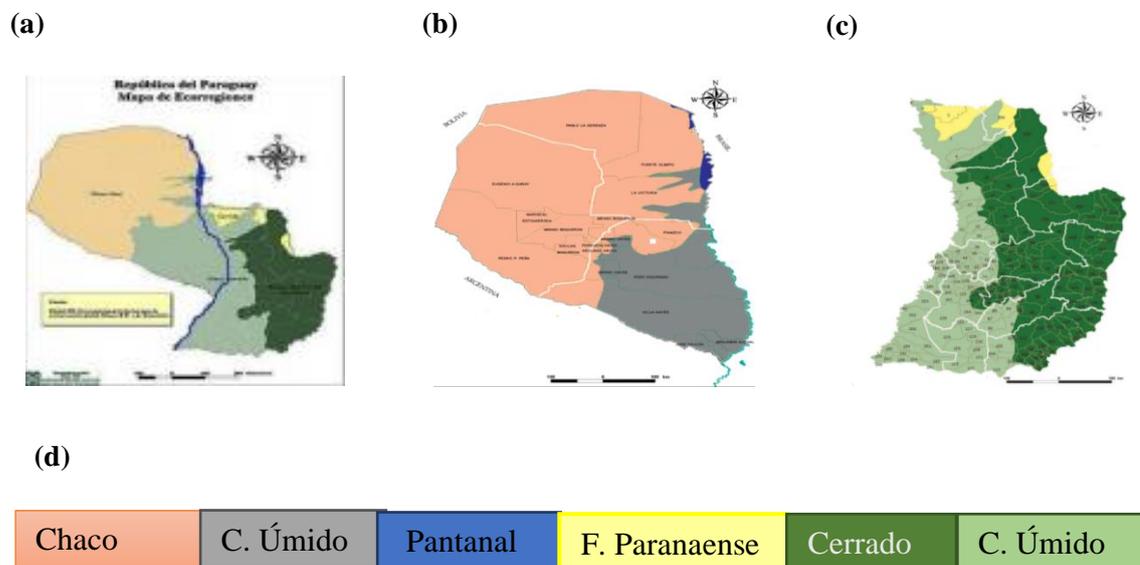
4	RESULTADOS .....	37
4.1	Isolamento e caracterização físico-química .....	37
4.2	Caracterização estrutural parcial .....	44
4.3	Avaliação da atividade antiparasitária do veneno e da BmatTX-IV.....	46
4.3.1	Avaliação da atividade leishmanicida contra formas promastigotas de <i>Leishmania infantum</i> .....	47
4.3.2	Atividade tripanocida <i>in vitro</i> contra formas epimastigotas de <i>T. cruzi</i> .....	48
4.3.3	Citotoxicidade <i>in vitro</i> contra fibroblastos NCTC 929 .....	49
5	DISCUSSÃO .....	50
5.1	Isolamento e caracterização físico-química .....	50
5.2	Caracterização estrutural parcial .....	54
5.3	Avaliação da potencial atividade antiparasitária e da citotoxicidade <i>in vitro</i> .....	55
5.3.1	Atividade Leishmanicida <i>in vitro</i> .....	55
5.3.2	Atividade Tripanocida <i>in vitro</i> .....	57
6	CONCLUSÕES .....	61
7	REFERÊNCIAS .....	62
8	ANEXOS .....	73
8.1	Termo de responsabilidade de amostra de componente de patrimônio genético.....	73
8.2	<i>Registro Nacional de Vida Silvestre</i> .....	75
8.3	<i>Permiso de transporte de espécimes</i> .....	76

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Paraguai e Biodiversidade

Com uma superfície aproximada de 406.752 km<sup>2</sup>, o Paraguai é um país mediterrâneo situado no centro da América do Sul, que do ponto de vista geográfico encontra-se dividido pelo rio Paraguai em duas regiões (Oriental e Ocidental) (Figura 1a) e cinco ecorregiões, assim definidas: Floresta Paranaense, Chaco úmido, Pantanal, Cerrado e o Chaco seco (Figura 1b & c). Dessa maneira, embora sendo um dos países com menor extensão territorial da América do Sul, apresenta uma rica biodiversidade (SALAS; FACETTI, 2007; NAUMANN; CORONEL, 2008; CACCIALI, 2010).

**Figura 1: Ecorregiões do Paraguai**



(a) Mapa geral do Paraguai (b) Região Ocidental (c) Região Oriental (d) Identificação das ecorregiões. Adaptado de Salas e Facetti (2007).

Em relação a fauna herpetológica, foram descritas no território paraguaio aproximadamente 77 espécies de anfíbios e 185 de répteis (CACCIALI, 2007), com aproximadamente 104 espécies de serpentes distribuídas nas ecorregiões mencionadas (CACCIALI, 2010).

## 1.2 Distribuição de serpentes e acidentes ofídicos no Paraguai

Das 20 famílias de serpentes conhecidas, sete foram descritas no Paraguai (Tabela 1).

**Tabela 1: Espécies de serpentes registradas no Paraguai**

Família não peçonhenta	Número de espécies	Família peçonhenta	Número de espécies
Anomalepididae	2	Elapidae	6
Boiidae	6	Viperidae	8
Colubridae	11		
Dipsadidae	66		
Leptotyphlopidae	3		
Typhlopidae	2		

As serpentes pertencentes as famílias Elapidae e Viperidae são responsáveis pelos acidentes ofídicos ocorridos no Paraguai, causando aproximadamente 400 acidentes anuais por envenenamento, com uma taxa de mortalidade de 2% (VERA et al., 2006; VERA, 2007; MARTÍNEZ; BARRIOS; PINANEZ, 2008; CACCIALI, 2010).

Os acidentes ofídicos apresentam um grande problema de saúde pública, representando uma causa importante de morbidade nas áreas rurais, onde este tipo de acidente tem maior frequência (VERA et al., 2006). As serpentes responsáveis pela maioria dos envenenamentos correspondem a espécies pertencentes ao gênero *Bothrops*, causando 92% dos acidentes ofídicos (VERA et al., 2006; MORENO, 2011), o que torna aos indivíduos do mencionado gênero, o grupo mais importante do ponto de vista médico.

As serpentes deste gênero compreendem 7 espécies distribuídas por todo o território paraguaio e são as seguintes: *B. alternatus*, *B. jararaca*, *B. jararacussu*, *B. diporus*, *B. pauloensis*, *B. moojeni* e *B. matogrossensis* (CACCIALI, 2010). Estas serpentes geralmente possuem hábitos noturnos, habitam principalmente locais com alto conteúdo de humidade como matas, áreas cultivadas e de pastagens, e ocasionalmente, podem ser arborícolas, sendo considerados animais muito agressivos (CACCIALI, 2009).

## 1.3 As serpentes do complexo *neuwiedii* e a *Bothrops matogrossensis*

As serpentes do complexo *neuwiedii*, com uma ampla distribuição pelo América do Sul, especificamente na Argentina, Bolívia, Brasil, Paraguai, Peru e Uruguai. Inicialmente o

grupo era formado por 12 subespécies, posteriormente, Silva e Rodrigues (2008) realizaram uma revisão taxonômica e propuseram a reclassificação em 7 espécies: *B. diporus*, *B. erythromelas*, *B. lutzi*, *B. pauloensis*, *B. neuwiedii*, *B. pubescens*, e *B. mato grossoensis*. Carrasco e colaboradores (2012), utilizando características filogenéticas das serpentes deste complexo, confirmaram a espécie *B. mato grossoensis*, alvo deste estudo (Figura 2a)

A distribuição de *B. mato grossoensis* inclui Peru, Bolívia, Brasil, Uruguai, o norte da Argentina, e a região Oriental e Ocidental do território paraguaio (Figura 2b) onde é conhecida popularmente com o nome de “*kyryry'o*”, e considerando sua ampla distribuição, é uma das serpentes responsáveis pelo maior número de casos de envenenamentos ofídicos no Paraguai (MONTEIRO et al., 2006; CACCIALI, 2009).

**Figura 2: *B. mato grossoensis* e distribuição**



- (a) Indivíduo mantido em cativeiro no Serpentário da *Universidad Católica de Asunción*. (b) Distribuição de *B. mato grossoensis* no América do Sul sinalizada com marcador vermelho (TIMMS RANGER, 2012).

#### 1.4 Veneno de serpentes e composição química

O surgimento dos venenos no Reino Animal para fins predatórios ou defesa, representou uma inovação crítica na evolução das serpentes, permitindo mudanças nas estratégias predatórias, da submissão mecânica da presa para uma forma baseada na atividade do veneno e da influência de seus componentes nos processos fisiológicos das vítimas (CALVETE et al., 2007; LOMONTE et al., 2014).

Estes venenos são secreções de glândulas salivares modificadas que podem incluir centenas de biomoléculas, incluindo peptídeos e proteínas, que podem ou não apresentar atividade enzimática, correspondendo a aproximadamente 90 a 95% da massa seca (Figura 3) (CALVETE et al., 2007; GEORGIEVA et al., 2008; MACKESSY, 2010). Diversas

ferramentas baseadas em técnicas de análise proteômica aplicadas na caracterização dos venenos, demonstram que a grande maioria dos seus componentes polipeptídicos pertencem a um estrito número de famílias proteicas (CASWELL et al., 2013). Diversos estudos propõem que as proteínas dos venenos evoluíram a partir de um pequeno grupo de genes ancestrais, os quais inicialmente não expressavam proteínas tóxicas, mas por diversos processos de duplicação, divergência e neofuncionalização, evoluíram por pressão seletiva para expressar produtos que posteriormente poderiam interferir nos diversos processos fisiológicos das presas (LOMONTE et al., 2014).

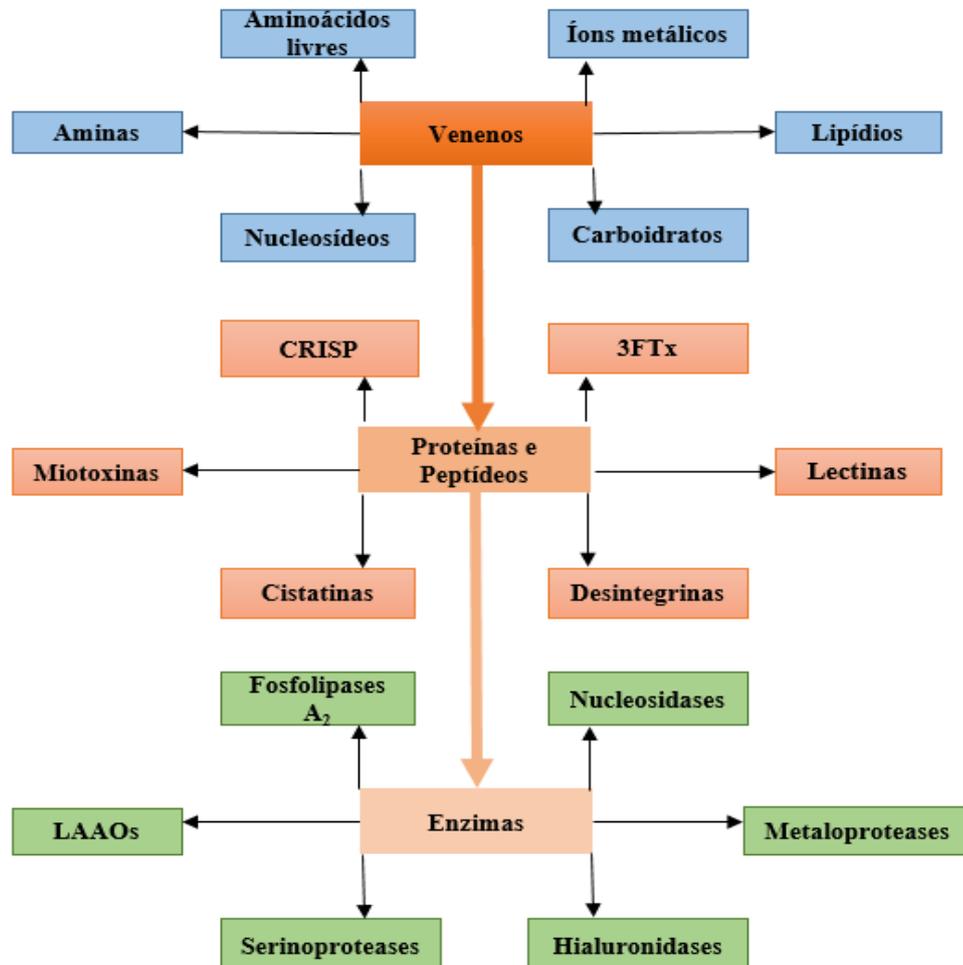
Adicionalmente, os demais componentes dessas complexas misturas podem incluir substâncias não proteicas, como cálcio, zinco, cobre, magnésio, entre outros, os quais segundo alguns estudos, são importantes para a estabilização de enzimas e atuam nos mecanismos catalíticos de determinados componentes enzimáticos presentes no veneno (FRIEDERICH; TU, 1971; BJARNASON; FOX, 1994; GEORGIEVA et al., 2008; ANGULO; LOMONTE, 2009; LOMONTE et al., 2014), além de outros componentes orgânicos como carboidratos, nucleosídeos, lipídios e aminoácidos livres.

Os componentes proteicos de venenos de serpentes possuem características comuns dentro de cada família, sendo típica a presença de neurotoxinas nos venenos das serpentes Hydrophiidae e Elapidae, enquanto que em venenos de Viperidae, são encontradas metaloproteases, serinoproteases, fosfolipases A<sub>2</sub>, L-aminoácido oxidases, além de outros componentes em menor concentração, como desintegrinas, lectinas do tipo C, hialuronidases, fosfodiesterases e nucleotidases (CALVETE et al., 2007; GEORGIEVA et al., 2008; MACKESSY, 2010; BERNARDES et al., 2013; LOMONTE et al., 2014).

As metaloproteases dos venenos das serpentes (svMP) têm recebido especial atenção devido a sua associação com diferentes sintomas proeminentes no envenenamento, principalmente hemorragia local e sistêmica, e compreendem um amplo grupo de enzimas dependentes de íons metálicos com ação hemorrágica (FOX; SERRANO, 2009; MACKESSY, 2010).

As serinoproteases dos venenos das serpentes (svSP) compreendem um grande número de enzimas que apresentam um resíduo de Serina altamente reativo na tríade catalítica, o qual exerce um papel crítico no processo. As svSP atuam em uma ampla variedade de alvos, as quais envolvem a cascata de coagulação, o sistema complemento, células endoteliais, plaquetas sanguíneas, entre outras (SERRANO; MAURON, 2005; GHORBANPUR et al, 2009, MACKESSY, 2010)

Figura 3: Composição química do veneno das serpentes



Na figura, observa-se a variabilidade de componentes presentes nos venenos das serpentes. Azul: Componentes não proteicos. Laranja: componentes proteicos sem atividade catalítica. Verde: componentes proteicos com atividade enzimática. Imagem adaptada de Georgieva e colaboradores (2008).

As L-aminoácido oxidases (LAAO) são flavoenzimas enantioesletivas constituídas por duas subunidades idênticas, catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos para formar  $\alpha$ -cetoácidos e amônia. Estudos sugerem que as LAAOs podem induzir agregação plaquetária, apoptose celular e citotoxicidade sendo alvo de diferentes abordagens na busca de uma potencial aplicabilidade biotecnológica (MACKESSY, 2010; GUO et al., 2012; OKUBO et al., 2012).

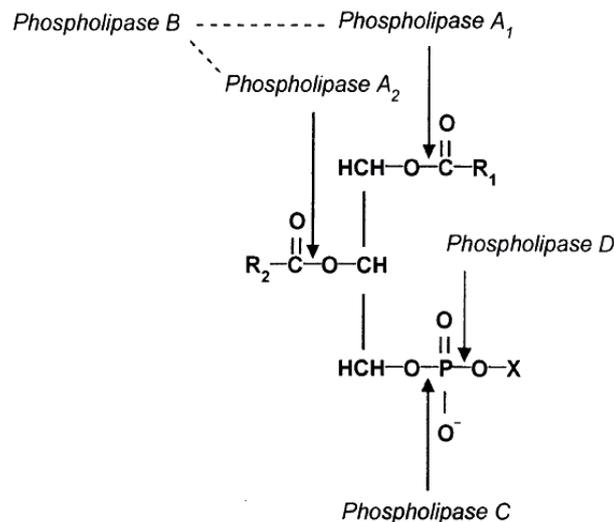
Outro tipo de proteínas presentes no veneno, as lectinas de tipo C, apresentam variadas atividades biológicas, como aglutinação de eritrócitos, ligação a carboidratos, inibição do

fator de Von Willebrand e diferentes efeitos patológicos. Estão formadas por heterodímeros  $\alpha\beta$  ligados por ponte dissulfeto, com duas subunidades de aproximadamente 14 kDa cada uma (SARRAY et al., 2004; GUIMARÃES-GOMES et al., 2004). Estudos sugerem que estas proteínas apresentam grande importância no contexto da busca de moléculas com potencial biotecnológico, devido ao desenvolvimento de diferentes pesquisas reportando sua atividade antitumoral contra diversas linhagens celulares (CARVALHO, et al., 2001; SARRAY et al., 2004; NOLTE et al., 2012; NUNES et al., 2012).

### 1.5 Fosfolipases A<sub>2</sub>

As fosfolipases, proteínas com ampla distribuição na natureza, são agrupadas com base na especificidade no sítio de hidrólise no fosfolipídio em: A<sub>1</sub>, A<sub>2</sub>, B, C e D (Figura 4), as fosfolipases A<sub>1</sub> e A<sub>2</sub> hidrolisam as ligações éster dos glicerofosfolipídios intactos nos C-1 e C-2 do glicerol, respectivamente, enquanto que as fosfolipases C e D hidrolisam as ligações fosfodiéster (DENNIS et al., 2011; NELSON; COX, 2011).

**Figura 4: Sítios de hidrólises dos vários tipos de fosfolipases**

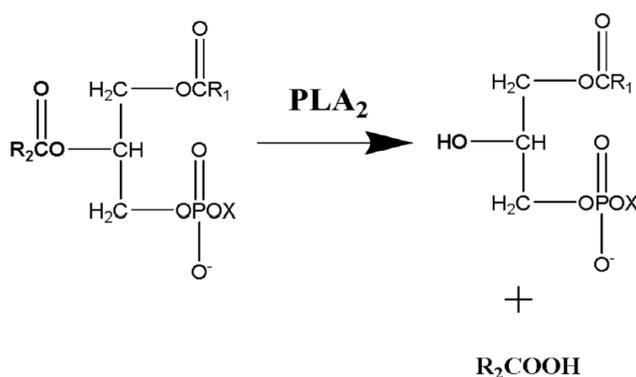


Regiões susceptíveis a hidrólise em uma molécula de 1,2 diacilglicerolfosfolipídio pelas diferentes fosfolipases (Adaptado de ROCHAT; MARTIN, 2000).

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s) (EC 3.1.1.4) catalisam a hidrólise de glicerofosfolipídeos na posição *sn*-2 do glicerol, liberando lisofosfolipídios e ácidos graxos (Figura 5). Estas enzimas constituem uma superfamília classificada com base na sequência de resíduos de aminoácidos, quantidade de pontes dissulfeto, massa molecular, dependência de cálcio, entre outras características físico-químicas, funcionais e estruturais. Assim sendo, as PLA<sub>2</sub>s podem ser agrupadas em seis tipos diferentes: PLA<sub>2</sub>s secretadas (sPLA<sub>2</sub>), citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), independentes de Ca<sup>+2</sup> (iPLA<sub>2</sub>), acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH), lisossomais, e do tecido adiposo (AdPLA<sub>2</sub>) (KINI; EVANS, 1989; ARNI; WARD, 1996; KINI, 2003; SCHALOSKE; DENNIS, 2006; BURKE; DENNIS, 2009; DENNIS et al., 2011; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013).

O primeiro grupo de PLA<sub>2</sub>s descritas foram as sPLA<sub>2</sub>s, sendo proteínas com massa molecular de 14 a 18 kDa, usualmente com 5 a 8 pontes dissulfeto, e com a presença de resíduos de histidina, tirosina e ácido aspártico nas posições 48, 52 e 99, respectivamente, compondo o sítio catalítico, sendo a presença do íon cálcio essencial para a catálise. Essas enzimas são encontradas em diferentes fontes, tais como tecidos de mamíferos, constituintes do pâncreas, assim como componentes de venenos de moluscos, artrópodes e serpentes (SIX; DENNIS, 2000; BURKE; DENNIS, 2009; STÁBELI et al., 2012).

**Figura 5: Hidrólise de fosfolipídio por PLA<sub>2</sub>**



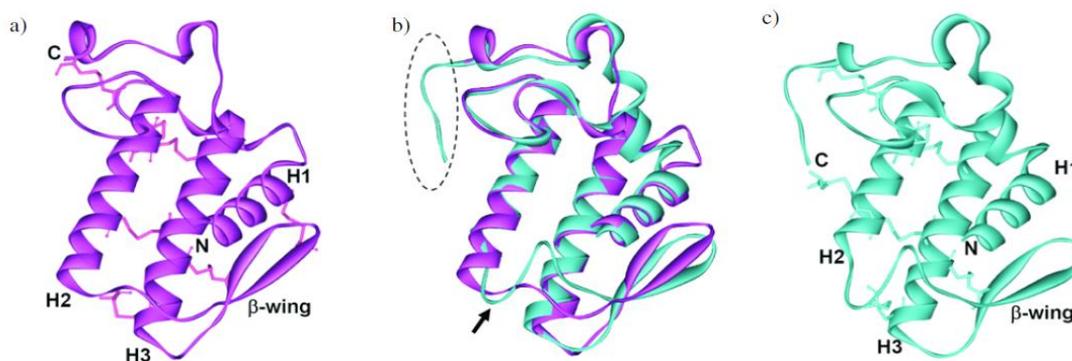
Reação de hidrólise de fosfolipídio catalisada por a PLA<sub>2</sub>, na posição *sn*-2, seguida pela posterior liberação de ácido graxo e lisofosfolipídios. Imagem adaptada de Burke e Dennis (2010)

As PLA<sub>2</sub>s dos venenos de serpentes (svPLA<sub>2</sub>) estão entre as principais proteínas tóxicas e desempenham um papel importante na captura, imobilização e digestão da presa, além de apresentarem uma grande diversidade de efeitos farmacológicos, tais como neurotoxicidade, cardiotoxicidade, miotoxicidade, atividade anticoagulante, atividade

hemolítica e hipotensora, assim como indutor de intensas reações inflamatórias (KINI; EVANS, 1989; OWNBY et al., 1999; KINI, 2003). Os produtos liberados durante o processo catalítico, tais como o ácido araquidônico e lisofosfolípídios, são potentes mediadores implicados na ampla variedade dos efeitos patológicos das fosfolipases, interferindo nos processos fisiológicos normais das presas ou vítimas (MACKESSY, 2010; LOMONTE; RANGEL, 2012; GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013).

Em relação a filogenia, as PLA<sub>2</sub>s presentes nos venenos da Família Elapidae, são classificadas como pertencentes ao Grupo I, enquanto que aquelas encontradas nos venenos da Família Viperidae pertencem ao Grupo II (LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; STÁBELI et al., 2012). Ambos os grupos apresentam estrutura conservada além da mesma tríade catalítica, mas apresentam diferenças que as distinguem, sendo estas: a posição de uma das sete pontes dissulfeto; assim como uma extensão de 5 a 7 resíduos na região C-terminal para o grupo II (Figura 6); e a presença do chamado “*loop* elapídico”, encontrado no grupo I, pela inserção de 2 a 3 resíduos na posição 52 a 65 da proteína (ARNI; WARD, 1996; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011).

**Figura 6: Comparação das estruturas tridimensionais das PLA<sub>2</sub> dos grupos I e II**



Representação estrutural evidenciando a composição de estruturas secundárias de uma PLA<sub>2</sub> do grupo I (a) e de uma PLA<sub>2</sub> do grupo II (c). (b) Superposição das estruturas demonstrando alta conservação da estrutura tridimensional, com exceção das regiões correspondentes a sequência C terminal (área pontilhada) das PLA<sub>2</sub>s do Grupo II, e o “*loop* elapídico” da PLA<sub>2</sub> do grupo I (seta). Imagem adaptada de Lomonte e Gutiérrez (2011).

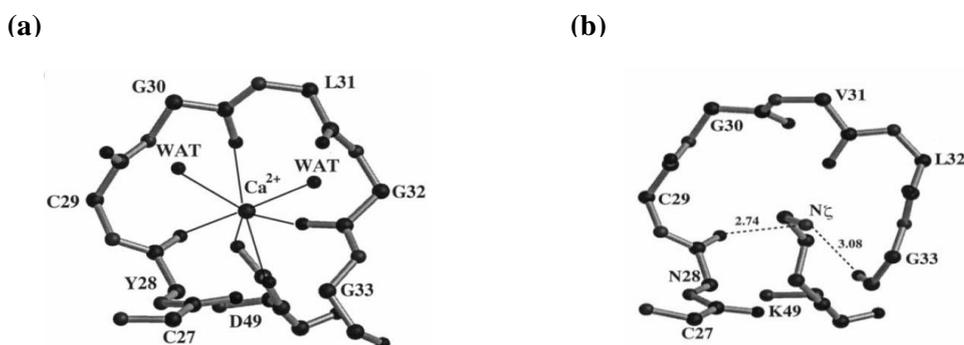
Como pode ser observado na figura 6, as PLA<sub>2</sub>s dos grupos I e II possuem alto grau de similaridade estrutural, distribuídas em três regiões, as quais incluem a hélice N-terminal, o *loop* ligante de cálcio, as regiões do sítio catalítico e os resíduos que compõem o canal

hidrofóbico ao qual é proposto ser responsável pela ligação aos fosfolipídios (ARNI; WARD, 1996).

Uma característica das fosfolipases é a variabilidade de valores de *pI* observáveis, podendo ser encontradas variantes ácidas e básicas. As PLA<sub>2</sub>s ácidas possuem um resíduo de ácido aspártico na posição 49 (PLA<sub>2</sub> Asp49), enquanto que entre as variantes básicas podem apresentar um resíduo de ácido aspártico ou lisina na mesma posição (PLA<sub>2</sub> Lys49). As PLA<sub>2</sub> Lys49, apesar de possuírem alta homologia estrutural com as PLA<sub>2</sub> Asp49, não apresentam atividade enzimática (OWNBY et al., 1999; CARDOSO, 2011 LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; LOMONTE; RANGEL, 2012; MORA-OBANDO et al., 2014).

De acordo com Arni e Ward (1996), a substituição do resíduo Asp49 por Lys49 impede a coordenação do íon Ca<sup>+2</sup> no sítio alostérico, que passa a estar ocupado pela cadeia lateral da lisina, impedindo a ativação do sítio catalítico, tornando inviável a reação enzimática (Figura 7). Desta forma, o resíduo Asp49 é considerado essencial para a atividade enzimática da PLA<sub>2</sub>, no entanto não foi demonstrada nenhuma diferença relevante em relação a estabilidade e conformação estrutural das variantes (SCOTT et al., 1990; ARNI; WARD, 1996; WARD et al., 1998; MARCHI SALVADOR, 2008; DOS SANTOS et al., 2009; STÁBELI et al., 2012).

**Figura 7: Representação do sítio de ligação de Ca<sup>+2</sup> de uma PLA<sub>2</sub>Asp49 e da região análoga em uma PLA<sub>2</sub>Lys49**



Representação gráfica dos resíduos 27-33 e 49, os quais compreendem o sítio de ligação do cálcio nas fosfolipases. a) Ilustração da coordenação do cálcio pela formação de uma bipirâmide pentagonal pela interação do Ca<sup>+2</sup>, com os átomos de oxigênio dos resíduos Tyr28, Gy30 e Gly32, dois átomos de oxigênio carboxilados do resíduo Asp49 e duas moléculas de água (WAT). b) PLA<sub>2</sub> Lys49, no qual o átomo N<sup>ε</sup> da cadeia lateral da Lisina, ocupa a posição do íon formando pontes de hidrogênio. Adaptado de Arni e Ward (1996) e Ward (1998).

Desde a descrição da primeira PLA<sub>2</sub> Lys49 (MARAGANORE et al., 1984), o número de PLA<sub>2</sub>s homólogas caracterizadas aumentou de maneira considerável, e diversas estratégias foram utilizadas com o objetivo de atingir uma melhor compreensão e identificação dos determinantes estruturais vinculados com a toxicidade destas proteínas. As PLA<sub>2</sub>s Lys49 são descritas como proteínas básicas com *pI* entre 7 e 10 e, apesar de não apresentarem atividade catalítica, possuem efeitos farmacológicos importantes como miotoxicidade, atividade edematogênica e anticoagulante (OWNBY et al., 1999; ANGULO; LOMONTE, 2009; LOMONTE et al., 2009).

As PLA<sub>2</sub>s Lys49 produzem lesões nas membranas de células musculares induzindo mionecrose por mecanismo independente de cálcio (OWNBY et al., 1999; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011). Acredita-se, que em virtude da riqueza de resíduos de Lys e Arg responsáveis pelo caráter catiônico destas proteínas, estes resíduos podem possuir um papel importante no reconhecimento dos alvos, assim como em sua atividade efetora (OWNBY et al., 1999; GUTIÉRREZ et al., 2008; LOMONTE et al., 2009).

Lomonte e colaboradores (1994) demonstraram que peptídeos sintéticos formados pelas regiões 115 a 129, correspondente a região C-terminal da miotoxina II de *B. asper*, pode induzir citotoxicidade, e posteriormente foi demonstrado que uma região equivalente da miotoxina AppK49 de *A. piscivorus piscivorus*, também é capaz de induzir mionecrose em ratos. Gutiérrez e Lomonte (1995) propõem que resíduos de aminoácidos de cadeia lateral com propriedades apolares e alcalinas presentes na região hidrofóbica da extremidade C-terminal são relevantes para induzir danos na membrana. Acredita-se que ocorra o reconhecimento de determinados sítios com carga negativa aos quais serviriam de ancoragem para as fosfolipases, que uma vez associadas, induziriam a desestabilização da membrana, resultando em uma alteração da permeabilidade e consequente morte celular. Estudos posteriores, baseados em modelagem molecular e cristalografia de raios x de PLA<sub>2</sub>s dimericas, sugerem que os resíduos catiônicos possam ser responsáveis pelos efeitos miotóxicos (DE ARAUJO et al., 1996; DA SILVA et al., 1998).

De acordo com Fernandez e colaboradores (2014), que integrou diversos dados referentes a miotoxicidade das fosfolipases A<sub>2</sub> Lys49, propôs um mecanismo de ativação alostérica baseado na ligação de um ácido graxo ao canal hidrofóbico estabilizando a forma dimérica com propriedade de acoplamento a membrana e posterior penetração da proteína, induzindo a desorganização na membrana e finalmente a morte celular.

Em virtude da diversidade de seus efeitos farmacológicos independentes da atividade enzimática, as fosfolipases A<sub>2</sub> Lys49 tem sido objeto de estudo por parte de diversos grupos

de pesquisa que buscam o melhor entendimento das bases estruturais de seu mecanismo de ação e as potenciais aplicações farmacológicas e biotecnológicas a serem advindas com este conhecimento (STÁBELI et al., 2012).

#### 1.6 Relevância dos estudos de caracterização do veneno de serpentes

O acesso a informações detalhadas referente aos diversos componentes dos venenos de serpentes possui grande importância científica e tecnológica com aplicação direta na medicina, considerando que as variações intra e interespecíficas da composição do veneno podem conduzir a diferentes manifestações clínicas nos envenenamentos (CALVETE et al., 2007; BERNARDES et al., 2013; LOMONTE et al., 2014).

Mediante o uso de ferramentas de análise proteômica, bioquímica e molecular, associadas aos grandes avanços recentes da biotecnologia, bioinformática, química sintética e analítica, a identificação e caracterização dos componentes do veneno abrem uma nova perspectiva de benefícios a serem usufruídos pela pesquisa básica e tecnológica, com grande potencial de desenvolvimento de novas estratégias de diagnóstico e terapias de acidentes ofídicos (LOMONTE et al., 2014). Não obstante, este conhecimento pode proporcionar a inovação em novas ferramentas para pesquisa científica, incluindo outras aplicações biotecnológicas, além da possibilidade de uma melhor compreensão da biologia e ecologia das serpentes (HARVEY et al., 1998; KOH et al., 2006; CALVETE et al., 2007; LOMONTE et al., 2014).

Embora a relação entre dieta e mudanças na composição do veneno tenha sido muito debatidos em toxinologia e herpetologia, numerosos estudos apoiam fortemente a hipótese de que esta variação pode estar também vinculada a outros fatores relacionados com o nicho ecológico, diferentes tipos de presas, sexo dos indivíduos, ontogenia, habitat, distribuição geográfica, e fatores sazonais como temperatura e precipitação (DALTRY et al., 1996; RODRIGUES et al., 1998; SASA, 1999; CALVETE et al., 2007; SOUSA et al., 2013; LOMONTE et al., 2014; MACÍAS-RODRÍGUEZ et al., 2014).

Como exemplo, os estudos de venômica de *Bothrops asper*, revelaram que existem variações na composição do veneno de indivíduos de regiões geográficas distintas, estabelecendo que componentes como as PLA<sub>2</sub>s, LAAOs e svMPs encontram-se em proporções diferentes em populações de duas regiões geográficas distintas na Costa Rica (litoral caribenho e pacífico), e refletem no perfil toxinológico do veneno. Uma informação importante para o desenvolvimento de soros antiofídicos na Costa Rica, foi a observação de

que os indivíduos de *B. asper* do litoral pacífico apresenta veneno com uma atividade proteolítica maior, enquanto que as serpentes do litoral caribenho apresentam maior atividade hemorrágica e miotóxica (ALAPE-GIRÓN et al., 2008; ANGULO; LOMONTE, 2009; LOMONTE et al., 2014).

É importante destacar que os estudos de caracterização dos constituintes dos venenos podem ajudar na predição dos perfis toxicológicos e nas manifestações clínicas nos quadros de envenenamentos. Como exemplo, geralmente os efeitos hemorrágicos dos venenos estão relacionados com a presença de svMPs, enquanto que a miotoxicidade é associada principalmente com PLA<sub>2</sub>s. Embora diversas toxinas apresentem uma grande variabilidade de subtipos, que podem diferir na sua atividade biológica, as análises proteômicas podem fornecer importantes informações para a clínica médica, principalmente nos casos de envenenamentos raros e pouco frequentes, onde o conhecimento acerca da composição proteica pode auxiliar na definição de estratégias do paciente (ESCALANTE et al., 2011; LOMONTE; GUTIÉRREZ, 2011; LOMONTE et al., 2014).

### 1.7 Toxinas e potencial aplicação em doenças negligenciadas

Desde 1950 até o ano 2013, o “*Food and Drug Administration*” (FDA) aprovou aproximadamente 1450 novos fármacos. No entanto, na última década, o nível crescente de investimento em pesquisa e desenvolvimento (P&D) por parte das empresas farmacêuticas, não foi acompanhado por um aumento correspondente no número de novos fármacos aprovados pela FDA, o que demonstra que a inovação terapêutica se tornou cada vez mais difícil. (KING, 2011; HARVEY, 2014). As razões pelo baixo rendimento da indústria farmacêutica no desenvolvimento de novos produtos são complexas, no entanto, uma questão recorrente nas discussões é o papel dos produtos naturais para o descobrimento de novos fármacos. Apesar da maioria dos medicamentos em uso clínico serem de origem natural ou derivados de estes, muitas indústrias farmacêuticas optaram por investir em outras alternativas emergentes na década de 1990, como a química combinatória/computacional e a genômica. Esta decisão pode estar diretamente associada ao baixo rendimento no desenvolvimento de novos fármacos observado as últimas décadas. Em virtude disto, os estudos de desenvolvimento baseados em fontes naturais diferenciadas têm recebido interesse renovado (ORTHOLAND; GANESAN, 2004; MUNOS, 2009; KING, 2011; PAMMOLLI et al., 2011; HARVEY, 2014).

A biodiversidade oferece uma colossal fonte de novas moléculas com potencial aplicabilidade biotecnológica, que podem apresentar grande utilidade para a inovação de novos fármacos (LEWIS; GARCIA, 2003; CALDERON et al., 2009; COSTA TORRES, 2010; KING, 2011, 2013; DA SILVA et al., 2014).

O primeiro exemplo de sucesso na obtenção de fármacos a partir de pesquisas com venenos de serpentes, foi o desenvolvimento do Captopril®, um medicamento utilizado como anti-hipertensivo inspirado no peptídeo potenciador de bradicinina do veneno de *B. jararaca* (código UNIPROT P01022) desenvolvido pelo laboratório *Squibbs and Sons*, atualmente *Bristol-Myers Squibb* (CALDERON, L., DA SILVA, L., SATBELI, R. 2010). Com o sucesso deste fármaco, venenos tem sido objeto de pesquisas na busca de novas moléculas com potencial aplicação farmacêutica e biotecnológica, desde então, foram identificadas novas utilidades para outros componentes dos venenos, sendo utilizados como reagentes em kits diagnóstico, ferramentas moleculares para pesquisa científica e bioativos em cosméticos (ZHANG, FALLA, 2009; HARVEY, 2014). Adicionalmente, novos produtos baseados nas toxinas de serpentes estão em desenvolvimento, baseados no potencial antitumoral das desintegrinas e lectinas e a possível capacidade de inibição da proliferação e infectividade de bactérias e protozoários. Tendo em conta o grande potencial biotecnológico dos venenos das serpentes, além da crescente necessidade de alternativas para os tratamentos de diversos quadros infecciosos produzidos por microrganismos super resistentes, este campo de pesquisa pode ser considerado promissor para ser explorado (FERREIRA, 1965; CARVALHO, DE et al., 2001; GONÇALVES et al., 2002; SÁNCHEZ, 2004; SARRAY et al., 2004; KOH et al., 2006; CUMMINGS, 2007; BASTOS et al., 2008; ADADE et al., 2011; CASTRO et al., 2011; ALARCÓ et al., 2012; OKUBO et al., 2012; KOH; KINI, 2012).

Neste contexto, as doenças tropicais negligenciadas são um grupo de doenças com diferentes características que afetam populações de países subdesenvolvidos, endêmicas em 149 países, afetando mais de 1,4 bilhões de pessoas, com um custo de milhões de dólares cada ano nas economias dos países em desenvolvimento (WHO, 2015).

Dentre as 17 doenças tropicais negligenciadas, pode-se citar aquelas causadas pelos protozoários tripanossomastídeos, especificamente por parasitas do gênero *Trypanosoma*, como o *T. brucei* e o *T. cruzi*, agentes causadores da Tripanossomíase Humana Africana e da Tripanossomíase Americana, respectivamente, assim como diferentes espécies do gênero *Leishmania*, que causam a Leishmaniose. Ambas afetam mais de 20 milhões de pessoas em todo o mundo, com uma incidência de aproximadamente 3 milhões de novas infecções por ano, e aproximadamente 400 milhões de pessoas em risco de infecção pela exposição aos vetores

(BERNARDES, ZANI, CARVALHO, 2013; ADADE et al., 2014; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

### 1.7.1 Doença de Chagas

A Tripanossomíase Americana ou Doença de Chagas, uma doença endêmica em 21 países da América Latina, é provocada pela infecção pelo protozoário *Trypanosoma cruzi*. De acordo a WHO, o número de pessoas infectadas é aproximado a oito milhões, e anualmente acontecem mais de dez mil mortes, mas existem dificuldades para atingir uma maior precisão nestes dados (CHATELAIN, 2014). O parasita apresenta os seguintes estágios e desenvolvimento: epimastigota, tripomastigota metacíclico, amastigota e tripomastigota sanguíneo. Dentre eles, o tripomastigota metacíclico é capaz de infectar uma grande variedade de vertebrados quando são transmitidos pelo vetor triatomíneo. (SCHUMUNIS, G., YADON, Z., 2009; KAYAMA, H.; TAKEDA, H., 2010).

Usualmente, a infecção nos humanos ocorre mediante a transmissão do parasita por insetos da subfamília Triatominae (Hemiptera, Reduviidae). O parasita é transmitido por um vetor triatomíneo, que ao se alimentar de sangue de indivíduos infectados, ingere as formas tripomastigotas sanguíneas. Dentro do inseto, no intestino médio do vetor, o parasita se transforma na forma epimastigota e se multiplica rapidamente, posteriormente, no intestino posterior, os parasitas transformam-se na forma tripomastigota metacíclico, que é disseminada com as fezes do inseto. Nesta forma, o parasito é capaz de penetrar nas células de um novo hospedeiro mediante picada, cortes ou mucosas (CLAYTON, 2010; KAYAMA, TAKEDA, 2010).

Também foram descritas formas de transmissão independentes aos vetores, como a transmissão por transfusão sanguínea, transplante de órgãos, transmissão congênita e transmissão oral por consumo de alimentos contaminados (ANDRADE et al., 2014; CHATELAIN, 2014).

Clinicamente, esta doença apresenta duas fases: a fase aguda e a fase crônica, afetando os sistemas gastrointestinal, nervoso e cardiovascular. Nas últimas décadas tornou-se um problema de saúde mundial em consequência do considerável aumento de infecções devido ao fluxo migratório (BERNARDES, ZANI, C, CARVALHO, 2013; ADADE et al., 2014; ANDRADE et al., 2014; CHATELAIN, 2014; NDAO et al., 2014).

Apesar dos esforços para desenvolver fármacos para o controle desta doença, o tratamento atual é dependente de agentes como o Benzonidazol (Rochagan®) e o Nifurtimox

(Lampit®), que além de causar diversos efeitos colaterais, apresentam uma modesta eficácia. Não obstante, foi reportado um aumento no número de cepas resistentes a ambos os medicamentos, o que torna urgente o desenvolvimento de novas alternativas farmacológicas (BERNARDES, ZANI, CARVALHO, 2013; ADADE et al., 2014; NDAO et al., 2014).

Considerando a diversidade de componentes nos venenos, estes poderiam ser fontes potenciais de moléculas com atividade antiparasitária, e já foram desenvolvidos diversos trabalhos onde a atividade contra *T. cruzi* foi avaliada utilizando venenos de serpentes e toxinas isoladas. Castillo-Vigil e colaboradores (2008) avaliam a susceptibilidade de formas epimastigotas e tripomastigotas de diversas cepas de *T. cruzi* a diferentes venenos de serpentes, demonstrando que estes são capazes de causar a morte do parasita. Por outro lado, Deolindo e colaboradores (2005) demonstraram que o veneno de *B. jararaca* inibe o crescimento das formas epimastigotas de *T. cruzi* e induz a morte celular mediante diversos danos a nível da estrutura celular.

### 1.7.2 Leishmaniose

A Leishmaniose é causada por diferentes espécies de parasitas do gênero *Leishmania*, que são transmitidas por vetores da família Psychodida (gênero *Phlebotomus* na Europa, África na Ásia, e *Lutzomyia*, na América e Oceania) (REVEIZ et al., 2013; STOCKDALE, NEWTON, R., 2013).

Esta doença apresenta diversas formas de manifestações clínicas: cutânea, mucocutânea e visceral. Estima-se que há aproximadamente 12 milhões de casos de Leishmaniose em todo o mundo, com aproximadamente 2 milhões de novos casos cada ano, e mais de 350 milhões de pessoas em risco de infecção (REVEIZ et al., 2013; ADADE et al., 2014; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

A forma infetante do parasita é denominada promastigota metacíclico, a qual é inoculada nos mamíferos mediante a picada do vetor flebótomo e infeta as células do sistema fagocítico mononuclear. No interior dessas células, as parasitas transformam-se nas formas amastigotas e multiplicam-se até ocasionar a lise da célula hospedeira, propagando dessa forma a infecção a outras células. Posteriormente, quando o mamífero é picado novamente por um vetor, os flebótomos ingerem os macrófagos infetados, os quais, liberam os amastigotas no intestino do inseto, que se transformam em promastigotas procíclicos, os quais, transformam-se em promastigotas metacíclicos, com alta capacidade de infecção (CHAPPUI et al., 2007; KAYE, SCOTT, P., 2011).

Em relação ao tratamento desta doença, o mesmo é baseado em antimoniais pentavalentes, como o Antimoniato de meglumina (Glucantime®) e o Estibogluconato de sódio (Pentostan®). A Pentamidina e Anfotericina B são medicamentos utilizados como segunda linha de tratamento, nos casos de resistência aos medicamentos de primeira linha. Estes medicamentos apresentam várias limitações, incluindo efeitos colaterais graves, custo alto, assim como o desenvolvimento de resistência, tornando-se assim de grande importância a busca de alternativas no tratamento desta doença (BERNARDES, L.; ZANI, C.; CARVALHO, 2013; MENNA-BARRETO; DE CASTRO, 2014).

No contexto de busca de moléculas com potencial leishmanicida utilizando como fonte os venenos de serpentes, diversos trabalhos mencionam a toxinas destes animais como potencial fonte de moléculas com atividade contra parasitas do gênero *Leishmania*. Costa Torres e colaboradores (2010) demonstraram que o veneno de *B. marajoensis*, assim como as LAAOs isoladas desse veneno, são capazes de inibir o crescimento de formas promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Também foi descrito que a BnSP-7, uma fosfolipase isolada do veneno de *B. pauloensis*, inibe a proliferação e infectividade de *L. amazonensis* (NUNES et al., 2013), sendo capaz também de ocasionar danos no nível ultra-estrutural nos parasitas.

Considerando o exposto, este trabalho apresenta a caracterização físico-química de uma fosfolipase A<sub>2</sub> básica isolada do veneno de exemplares de *B. mattogrossensis* provenientes do Paraguai, assim como a avaliação da atividade antiparasitária contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* e formas promastigotas de *L. infantum*.

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Realizar a purificação, caracterização físico-química, estrutural e biológica de uma fosfolipase A<sub>2</sub> Lys49 básica do veneno de *Bothrops matogrossensis* proveniente do Paraguai.

### 2.2 Objetivos específicos

Isolar em alto grau de pureza uma fosfolipase A<sub>2</sub> Lys49 inédita a partir do veneno de *Bothrops matogrossensis*;

Determinar massa molecular, ponto isoelétrico e estrutura primária;

Realizar a análise de similaridade em relação a outras fosfolipases de venenos de serpentes;

Avaliar a potencial atividade antiparasitária *in vitro* do veneno e da PLA<sub>2</sub> isolada contra formas promastigotas de *Leishmania infantum* e contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*;

Determinar potencial citotóxico em fibroblastos NCTC 929.

### 3 MATERIAIS E MÉTODOS

#### 3.1 Obtenção de veneno de *B. matogrossensis*

O veneno foi extraído de serpentes mantidas em cativeiro no serpentário da Universidad Católica de Asunción-Paraguai. Em seguida, foram dessecados e armazenados a 4°C no *Centro Para el Desarrollo de la Investigación Científica* (CEDIC), no mesmo país. Posteriormente, o veneno foi transportado ao Centro de Estudos de Biomoléculas Aplicadas a Saúde, CEBio-UNIR-FIOCRUZ-RO. (Autorização N° 01/14, Secretaria del Ambiente, SEAM-Paraguai).

#### 3.2 Isolamento e caracterização físico-química da PLA<sub>2</sub> básica do veneno de *B. matogrossensis*

##### 3.2.1 Cromatografia de Troca catiônica e de Fase Reversa

Aproximadamente, 40 mg do veneno dessecado de *B. matogrossensis* foi suspenso em 1 mL do tampão Bicarbonato de amônio (NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> – AMBIC) 50 mM pH 8,0 e centrifugado a 2000 *xg* durante 5 minutos para retirada do material insolúvel. Para o isolamento da proteína de interesse, o veneno foi submetido a fracionamento utilizando dois passos cromatográficos:

A primeira etapa cromatográfica foi realizada por Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (HPLC), utilizando uma coluna de CM-Sepharose FF® (1x 30 cm), cuja matriz é composta de agarose e o grupo funcional de Carboximetil (OCH<sub>2</sub>COO-), previamente equilibrada com AMBIC 50 mM, (solução A), eluída sob gradiente de 0 a 100% de AMBIC 500 mM pH 8,0 (solução B) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/min, em sistema de cromatografia *Akta purifier* (GE). A eluição foi monitorada em 280 nm e as frações coletadas manualmente foram identificadas, liofilizadas e armazenadas a -20°C.

Posteriormente, a fração 7, proveniente da cromatografia de troca catiônica, foi liofilizada e solubilizada em ácido trifluoroacético (TFA) 0,1% (solução A) e submetida a HPLC em coluna C18 (25 x 0,45 cm – Discovery), previamente equilibrada com a solução A e eluída sob o gradiente de 0 a 100% de solução B (acetonitrila (ACN) 99,9% e TFA, 0,1%) em 5 volumes de coluna, sob fluxo de 1 mL/min. A eluição foi monitorada em 280 nm e as

frações coletadas manualmente foram identificadas, secas no rotovaporador e armazenadas a 20°C.

### 3.2.2 Eletroforese em gel de Poliacrilamida com dodecil sulfato de sódio

A eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% (m/v), em condições redutoras na presença de dodecil sulfato de sódio (SDS) foi realizada em sistema descontínuo de pH, conforme descrito por LAEMMLI, 1970.

As frações obtidas após as cromatografias foram liofilizadas e, posteriormente, solubilizadas em água deionizada e misturadas na razão 1:1 (v/v) com tampão de amostra (SDS 4%, azul de Bromofenol 0,2%, Glicerol 20% e Tris 100 mM pH 6,8). A mistura foi aquecida em banho-maria a 75°C por 15 minutos e aplicadas no SDS-PAGE.

Ao término da separação das proteínas, o gel foi lavado com água deionizada para a remoção do excesso de SDS. Em seguida, o mesmo foi fixado em solução aquosa de metanol 40% (v/v) e ácido acético 7% (v/v) pelo período de 30 minutos. Em seguida, o gel foi corado durante 1 hora, sob leve agitação em solução de *Comassie Brilliant Blue G-250*® 0,08% (m/v), sulfato de amônio 8% (m/v), ácido o-fosfórico 1,6% (m/v) e metanol 20% (v/v). O excesso de corante foi retirado por imersão em solução descorante contendo etanol 4% e ácido acético 7% (v/v) em água. Várias trocas desta solução foram feitas até a obtenção da coração adequada. A imagem dos géis foi obtida com uso de equipamento *Image scanner*® (GE *Healthcare Lifesc.*) e a massa molecular relativa (Mr) determinada com o uso do programa IQTL® (GE *Healthcare Lifesc.*) comparando-se as distâncias relativas de migração das amostras e dos padrões de massa molecular.

### 3.2.3 Confirmação de massa molecular por espectrometria de massa

A espectrometria de massas foi realizada em equipamento de MALDI (dessorção assistida por ionização da matriz a laser), com dois analisadores TOF (AXIMA TOF2 *Shimadzu Biotech*), operando em modo linear, utilizando ácido sinapínico como matriz de ionização, e 1 µg da proteína, em uma proporção 3:1 respectivamente. Como calibrantes foram utilizados insulina, (5.734,5 Da), Citocromo C (12.361,9 Da), Apomioglobina (16.952,2 Da), Aldolase (39.212,2 Da) e Albumina (66.430,0 Da).

### **3.2.4 Determinação de Ponto Isoelétrico da PLA<sub>2</sub> isolada em SDS-PAGE Bidimensional (2D)**

Nesta etapa, a proteína foi submetida a focalização em fita de 7 cm, com valores de pH variando entre 3 a 10 de forma não linear.

Para a reidratação da fita, aplicou-se 250 µL de amostra solubilizada em solução de reidratação. Reidratou-se as fitas durante aproximadamente 12 horas, e após este período, levou-se a fita ao sistema focalizador onde a programação formada pelas seguintes etapas foi aplicada: (1) 500 V até 500 Vh, (2) 1000 V até 800 Vh, (3) 8000 V até 11300 Vh e (4) 8000 V até 300 Vh.

Finalizada a focalização, a fita contendo a PLA<sub>2</sub> foi reduzida e alquilada e a tira posicionada na porção superior do Gel SDS-PAGE 12,5% (m/v) para realização da segunda dimensão. (15 mA, 90 minutos). O gel foi fixado, corado e descorado conforme descrito no item 3.2.2. A imagem do gel foi obtida com auxílio de equipamento *Image scanner III*© e analisada com auxílio do programa *IQTL*® (GE Healthcare Lifesc).

### 3.3 Caracterização estrutural parcial

#### 3.3.1 Sequenciamento de resíduos de aminoácidos por degradação química de Edman da PLA<sub>2</sub> isolada

Para a determinação dos resíduos de aminoácidos a partir da extremidade N-terminal utilizou-se aproximadamente 10 µg da proteína isolada. Com um sequenciador automático de PPSQ-33 (*Shimadzu, Kyoto, Japão*), a sequência foi obtida por método de degradação de Edman (EDMAN, 1950).

#### 3.3.2 Sequenciamento “*de novo*”

A análise espectrométrica foi realizada em um Nano Acquity (*Waters*) HPLC acoplado ao espectrômetro *OrbitrapVelos* (*Thermo Scientific*). Uma alíquota do digesto trípico foi injetada e separada em coluna C18 (75 µm Oi, 10 cm, Nano Acquity, 1,7 µm BEH *column*, *Waters*). Os peptídeos foram eluídos com o seguinte gradiente: 1 a 40 %B em 20 minutos, seguido por gradiente de 40% a 60% de B em 5 minutos sob fluxo de 250 nL/minuto. A solução A continha de ácido fórmico 0,1 % (v/v) em água e a solução B ácido fórmico 0,1 % (v/v) em acetonitrila). A massa dos peptídeos (m/z: 300 – 1700) foram medidos no *Orbitrap* à resolução de 60.000 a m/z 400. Os peptídeos mais abundantes foram selecionados e fragmentados em célula de colisão HCD com energia de colisão normalizada (NCE) de 40 % com nitrogênio sendo usado como gás de colisão. Os fragmentos foram detectados no *Orbitrap* com resolução de 7500 FWHM a 400 m/z. Os dados foram coletados com *Thermo Xcalibur* (v.2.1.0.1140). Este experimento foi realizado em colaboração com o Dr Saulo Luís Da Silva, do Laboratório Nacional de Luz Síncrotron (LNLS), cidade de Campinas, São Paulo.

#### 3.3.3 Análise de similaridade da sequência primária

Após a obtenção das sequências parciais da PLA<sub>2</sub> isolada, foi realizada a busca por similaridade utilizando o algoritmo BLAST e o alinhamento múltiplo da sequência obtidas com outras proteínas relacionadas utilizando-se o Clustal W (disponível em <http://www.ebi.ac.uk/tools/msa.clustalw2/>).

### 3.4 Caracterização Biológica

#### **3.4.1 Avaliação de atividade antiparasitária *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania infantum* (MCAN/ES/92/BCN28)**

Para a realização deste teste, formas promastigotas de *L. infantum* foram cultivadas em uma concentração de  $1,5 \times 10^6$  parasitas/mL em placas de 96 poços, utilizando o meio de cultura *Schneider*, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF). A placa foi incubada a 26°C durante 48 horas, com diferentes concentrações de veneno e proteína purificada (3,12 - 100 µg/mL). Cada concentração foi testada em triplicata. Posteriormente, foi adicionada uma solução de Resazurina, 3 mM. A placa foi novamente submetida a incubação a 26 °C durante 4 horas e por último, a absorvância foi determinada a 570 e 600 nm utilizando um espectrofotômetro multimodal *Synergy H1* (*Biotek*). O fármaco de referência Pentamidina, na concentração 100 µg/mL foi utilizado como controle positivo, e os parasitas em incubados com médio de cultura foi considerado como controle de crescimento. A eficácia do veneno e da proteína testada foi estimada calculando a porcentagem de atividade anti-promastigota.

#### **3.4.2 Avaliação de atividade antiparasitária *in vitro* contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* CL Clone B5**

Para a avaliação da atividade tripanocida, formas epimastigotas de *T. cruzi* da Cepa CL clone B5 foram cultivadas na concentração de  $2,5 \times 10^5$  parasitas/mL em placas de 96 poços, utilizando o médio de cultura Liver Infusion Tryptose (LIT), suplementado com 10% de SBF. A placa foi incubada a 26°C durante 72 horas, com diferentes concentrações de veneno e proteína purificada (3,12 - 100 µg/mL). Cada concentração foi testada em triplicata. Posteriormente, foi adicionada uma solução de 200 µM de *Chlorophenol Red-β-D-galactoside* (CPRG). A placa foi novamente submetida a incubação a 37 °C durante 4 horas e por último, a absorvância foi monitorada a 570 nm utilizando um espectrofotômetro multimodal *Synergy H1* (*Biotek*). O fármaco de referência Benzonidazol, na concentração 100 µg/mL foi utilizado como controle positivo, e os parasitas em incubados com médio de cultura foi considerado como controle de crescimento. A eficácia do veneno e da proteína testada foi estimada calculando a porcentagem de atividade anti-epimastigota.

### 3.4.3 Avaliação de citotoxicidade *in vitro* em fibroblastos NCTC 929

Para determinar a citotoxicidade do veneno e da proteína isolada, aproximadamente  $2,5 \times 10^4$  células/poço foram cultivadas em placas de 96 poços, utilizando o médio de cultura MEM, suplementado com 10% de soro fetal bovino (SBF). A placa foi incubada a 36°C durante 48 horas, com diferentes concentrações de veneno e proteína purificada (3,12 - 100 µg/mL). Cada concentração foi testada em triplicata. Posteriormente, foi adicionada uma solução de Resazurina, 3 mM. A placa foi novamente submetida a incubação a 36 °C durante 4 horas e por último, a absorbância foi monitorada a 570 e 600 nm utilizando um espectrofotômetro multimodal Synergy H1 (Biotek). Células incubadas com médio de cultura foram consideradas como controle de viabilidade celular. A atividade do veneno e da proteína testada foi estimada calculando a porcentagem de viabilidade.

### 3.5 Análise estatística

A análise estatística foi realizada utilizando o *software GraphPad PRISM, versão 5.0*. Os resultados foram expressos como Média e Desvio Padrão. O teste estatístico utilizado foi o ANOVA, com valor de  $P < 0,05$  considerado como significativo, e como post-teste foi utilizado o teste *Turkey*.

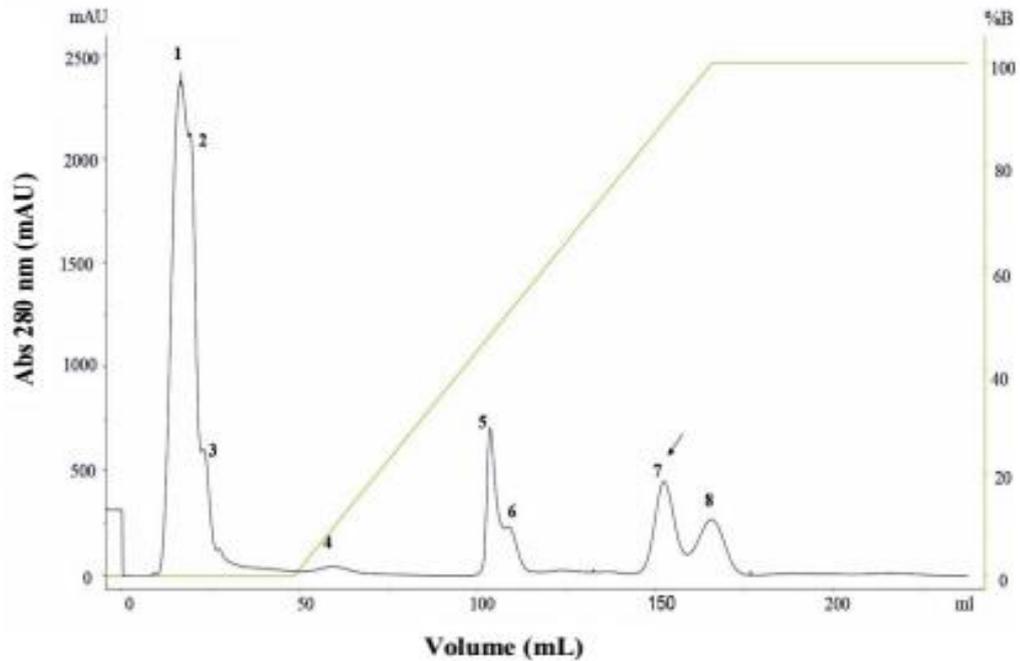
## 4 RESULTADOS

### 4.1 Isolamento e caracterização físico-química

Para o isolamento da PLA<sub>2</sub>, o primeiro passo desenvolvido foi uma cromatografia de troca catiônica, onde foram obtidos oito frações (Figura 8), os quais foram coletados e liofilizados. Uma vez secos, foram submetidas a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras (Figura 9), onde foi possível observar na linha 7, uma banda principal com massa molecular aparente de aproximadamente 14 kDa, valor compatível com as PLA<sub>2</sub>s. O pico 7 foi submetido a cromatografia de fase reversa. Neste passo, foi obtida uma fração principal (Figura 10), e visando eliminar potenciais contaminantes residuais, a fração foi recromatografada nas mesmas condições (Figura 11) obtendo-se assim a proteína com alto grau de pureza, o que pode ser observado no gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras (Figura 12), no qual foi obtida uma banda principal com massa molecular aparente de aproximadamente 14 kDa.

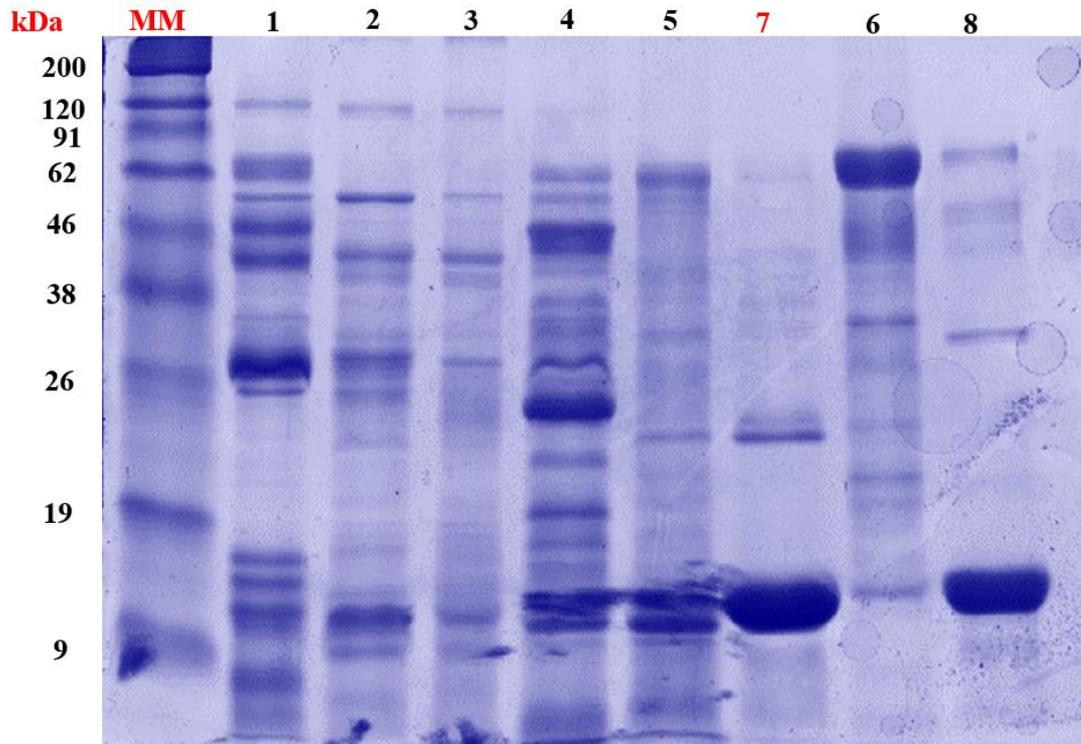
Com a finalidade de confirmar a pureza da proteína isolada, determinar o ponto isoelétrico e a massa molecular exata, foi desenvolvida a eletroforese bidimensional (Figura 13) e espectrometria de massa MALDI TOF (Figura 14), onde a proteína isolada apresentou *pI* de 9,3 e valor de *m/z* de 13.555,82 na forma monoprotionada, que corresponde ao valor de 13.554,81 Da.

**Figura 8: Perfil cromatográfico do veneno de *B. mattogrossensis* em Cromatografia de Troca Catiônica**



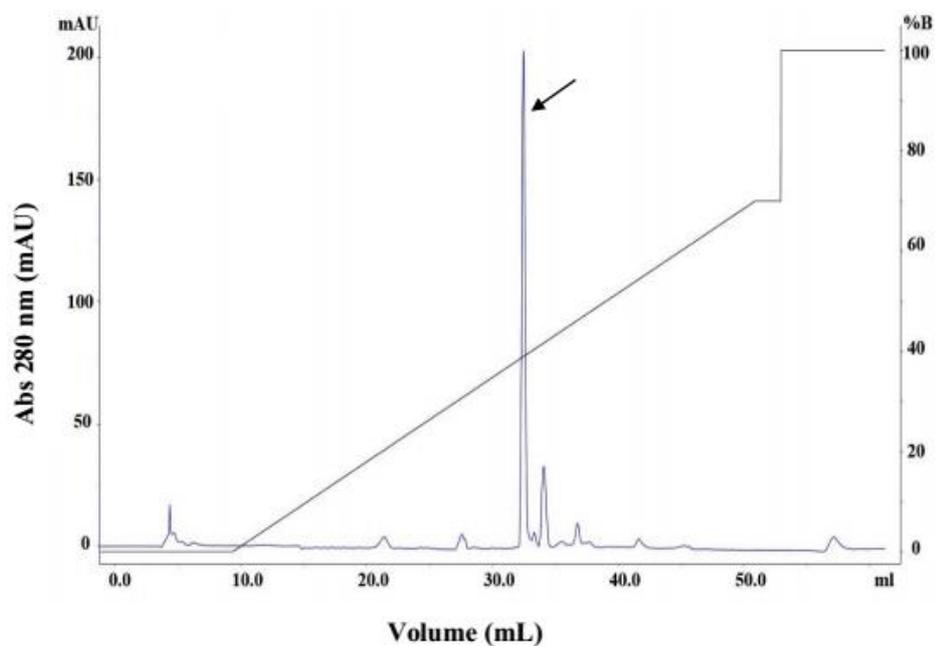
Perfil cromatográfico do veneno de *B. mattogrossensis* (40 mg) em coluna CM-Sepharose. A coluna foi equilibrada com tampão bicarbonato de amônio 0,05 M, pH 8,0 e eluída com gradiente de concentração de 0-100% de tampão bicarbonato de amônio 0,5 M, pH 8,0 (AMBIC). Fluxo constante de 1 mL/minuto. A absorbância foi monitorada a 280 nm. Foram obtidos 8 picos cromatográficos principais que foram coletados, liofilizados e submetidos a eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% em condições redutoras (Figura 9). A seta indica a fração com a proteína de interesse.

**Figura 9: Perfil eletroforetico das frações provenientes da Cromatografia de Troca Catiônica**



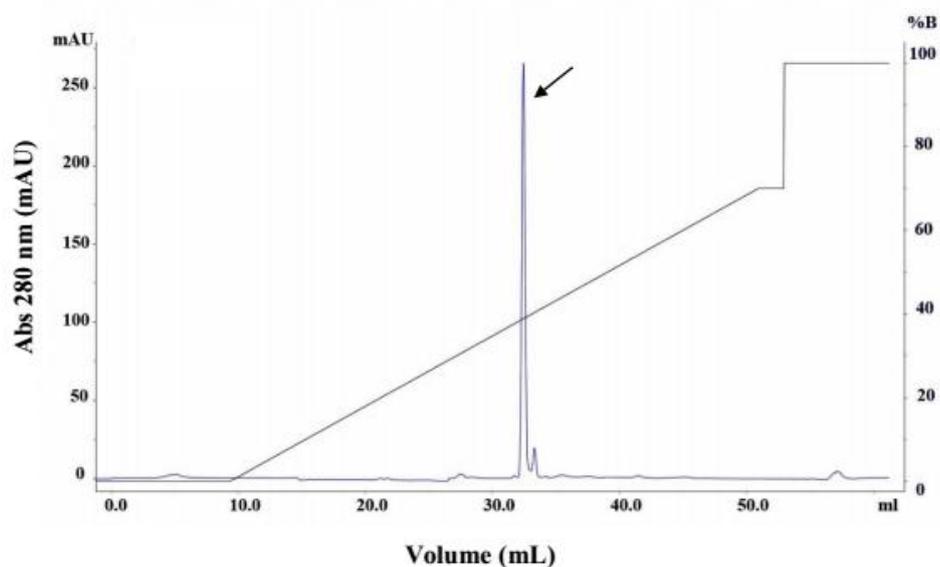
Eletroforese em gel de poli-acrilamida 12,5% dos 8 picos cromatográficos liofilizadas, provenientes da cromatografia de troca catiônica (Figura 8). MM: Padrão de Massa molecular; linha 1, pico 1; linha 2, pico 2; linha 3, pico 3; linha 4, pico 4; linha 4, pico 5; linha 6, pico 6; linha 7, pico 7, linha 8, pico 8. Na linha 7, destacado em vermelho, é possível observar uma banda principal com massa molecular aparente de 14 kDa.

**Figura 10: Perfil cromatográfico da Fração 7 submetida a cromatografia de fase reversa**



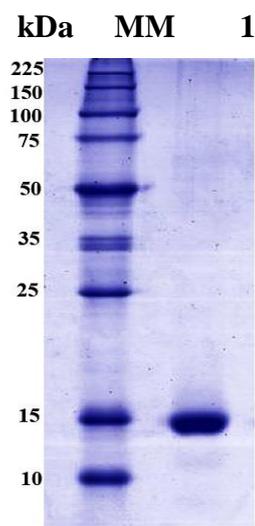
Cromatografia de fase reversa do pico 7, proveniente da cromatografia de troca catiônica (Figura 8). Este processo cromatográfico foi realizado na coluna *Discovery* (C18 25 x 0,45 cm) previamente equilibrada com TFA 0,1% (Solvente A) e eluída com acetonitrila 99% + TFA 0,1% (Solvente B) em gradiente 0-100%, sob fluxo constante de 1 mL/minuto. A eluição da proteína foi monitorada em 280 nm. O pico principal indicado pela seta foi submetido a uma recromatografia nas mesmas condições para eliminar contaminantes residuais (Figura 11).

**Figura 11: Perfil cromatográfico da fração 7 recromatografada**



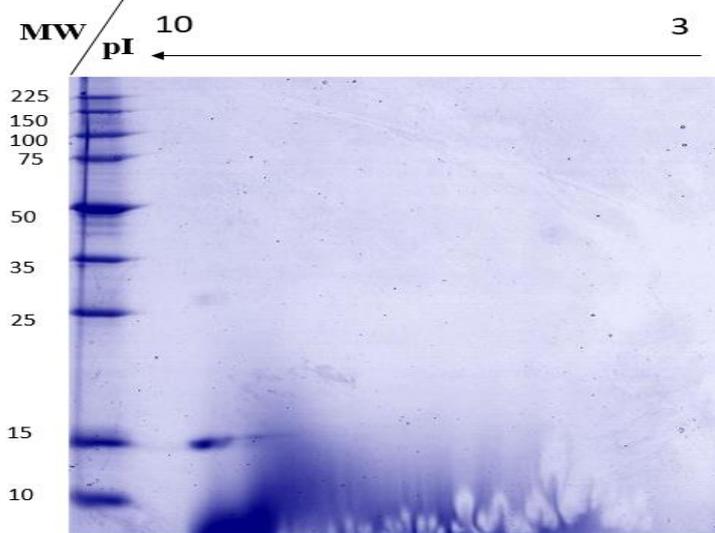
Recromatografia da fração principal obtida na cromatografia de fase reversa do pico 7 (Figura 10) proveniente da cromatografia de troca catiônica (Figura 8) realizada em coluna *Discovery C18* (25 x 0,45 cm) previamente equilibrada com TFA 0,1% (Solvente A) e eluída com ACN 99% + TFA 0,1% (Solvente B) em gradiente 0-100%, sob fluxo constante de 1 mL/minuto. A eluição da proteína foi monitorada em 280 nm. A seta indica a proteína de interesse.

**Figura 12: Perfil eletroforetico da proteína isolada**



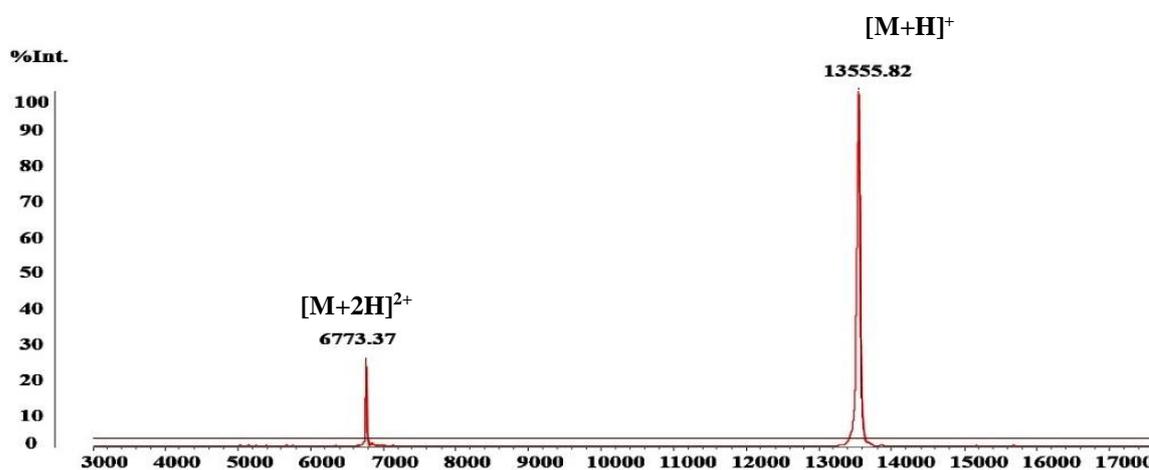
Eletroforese em gel de poliacrilamida 12,5% da fração principal obtida na recromatografia de fase reversa (Figura 11). MM: padrão de massa molecular, e na linha 1, pode-se observar uma proteína isolada em alto grau de pureza com massa molecular aparente de 14 kDa, compatível com PLA<sub>2</sub>s. A amostra foi submetida a eletroforese Bi-dimENSIONAL e a espectrometria de massa MALDI TOF para determinação de pI e massa molecular exata.

**Figura 13: Eletroforese Bi-dimENSIONAL**



Eletroforese Bi-dimENSIONAL da proteína isolada do veneno de *B. matogrossensis*. A proteína foi submetida a focalização em fitas de 10 cm, com valores de pH variando entre 3 a 10, de forma não linear. Finalizada a focalização, a fita contendo a PLA<sub>2</sub> foi reduzida e alquilada e a tira posicionada na porção superior do Gel SDS-PAGE 12,5% (m/v) para realização da segunda dimensão. Pode-se observar o pI da proteína: 9,3 e a massa molecular aparente de 14 kDa.

Figura 14: Espectrometria de massa



Espectro de massa MALDI-TOF da proteína de interesse, demonstrando valor de m/z de 13.555,82 na forma mono protonada  $[M+H]^+$  e de 6.773,37 na forma duplamente protonada  $[M+2H]^{2+}$ , obtendo assim o valor de massa molecular de 13.554,81 Da. Foi utilizada como matriz ionizante uma solução saturada de ácido sinapínico em acetonitrila que foi homogeneizada com a amostra em uma proporção de 3:1 (matriz/proteína), sendo colocada para cristalizar em placa de MALDI em temperatura ambiente para posterior introdução na câmara a vácuo e análise em modo linear.

## 4.2 Caracterização estrutural parcial

Uma vez determinada a pureza da proteína isolada, foi realizado o sequenciamento dos resíduos de aminoácidos. Mediante sequenciamento por degradação química de Edman, foi possível identificar 51 resíduos. Posteriormente, a sequência obtida foi submetida a alinhamento múltiplo com as sequências de resíduos de aminoácidos das PLA<sub>2</sub>s isoladas por Moura e colaboradores (2014) (Figura 15), o que confirmou que a proteína é uma PLA<sub>2</sub> isolada inédita, a qual foi denominada BmatTX-IV, uma fosfolipase A<sub>2</sub> básica, cataliticamente inativa, isolada do veneno de *B. matogrossensis*.

Posteriormente, em colaboração com o Laboratório Nacional de Luz Síncrotron, foi possível identificar 81 resíduos de aminoácidos (aproximadamente 80% da sequência) mediante sequenciamento “*de novo*”, o que permitiu realizar o alinhamento múltiplo com sequências disponíveis no banco de dados (Figura 16) correspondentes a outras fosfolipases A<sub>2</sub> básicas Lys49 do veneno de outras espécies de serpentes do gênero *Bothrops* (Tabela 1).

**Figura 15: Alinhamento múltiplo da sequência de resíduos de aminoácidos da BmatTX-IV com sequências de PLA<sub>2</sub>s Lys 49 isoladas de *B. matogrossensis***

BmatTX-IV	SLVELGKMILQETGKNPVTSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCY	
BmatTX-I	SLVELGKMILQETGKNPVTSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCCY	98%
BmatTX-II	SLVELGKMILQETGKNPACSYPAYGCNC	90%
BmatTX-III	DLVELAKMILLETGKNPLPSYGAYGCYCGWGG	76%
	:*.*.*.****:*:**** *****:***:*	

Análise de similaridade dos 51 resíduos de aminoácidos da BmatTX-IV com fosfolipases básicas isoladas por Moura e colaboradores (2014) evidenciando que a BmatTX-IV, representa uma PLA<sub>2</sub> inédita. “\*” indica resíduos de aminoácidos idênticos, “:” indica conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes, “.” indica conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes. Observa-se o resíduo de Lisina na posição 49 da BmatTX-IV (ressaltado em amarelo), indicando que se trata de uma PLA<sub>2</sub> cataliticamente inativa

**Figura 16: Alinhamento múltiplo dos resíduos de aminoácidos da BmatTX-IV com seqüências de outras PLA<sub>2</sub>s já caracterizadas**

BmatTX-IV	SLVELGKMILQETGKNPVTSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCC	50
BthTX-I	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCC	50
Bnsp-7	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGQPKDATDRCCYVHKCC	50
Piratoxin-Li	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCC	50
BbTX-II	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCC	50
Miotoxin	SLFELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCC	50
MjTX-I	SLVELGKMILQETGKNPAKSYGAYGCNCGVLGRGKPKDATDRCCYVHKCC	50
	** .***** .*****:*****	
BmatTX-IV	Y-----DKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLREN-	81
BthTX-I	YKKLTCGDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL	100
Bnsp-7	YKKLTCGDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL	100
Piratoxin-Li	YKKLTCGDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL	100
BbTX-II	YKKLTCGDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNPCLKELCECDKAVAICLRENL	100
Miotoxin	YKKLTCGDPKKDRYSYSWKDKTIVCGENNSCLKELCECDKAVAICLRENL	100
MjTX-I	YKKLTCGDPKKDRYSYDWNKKTIVCGEENPCLKQLCECDKAVAICLRENK	100
	* :*****:*.** :*****	
BmatTX-IV	-----	
BthTX-I	GTYNKKYR-YHLKPFCKKADAC	121 79%
Bnsp-7	GTYNKKYR-YHLKPFCKKADPC	121 78%
Piratoxin-Li	GTYNKKYR-YHLKPFCKKADKC	121 79%
BbTX-II	NTYNKKYR-YHLKPLCKKADAC	121 79%
Miotoxin	NTYNKKYR-YLKLPLCKKADAC	121 78%
MjTX-I	GTYNKKRD-VYLPFCDKGRDC	121 77%

Alinhamento múltiplo dos 81 resíduos de aminoácidos da BmatTX-IV isolada neste trabalho, com fosfolipases básicas Lys49 já caracterizadas previamente. “\*” indica resíduos de aminoácidos idênticos, “:” indica conservação entre grupos de propriedades fortemente semelhantes, “.” Indica conservação entre grupos de propriedades fracamente semelhantes. Observa-se um alto grau de similaridade entre as fosfolipases. O resíduo de lisina 49 está em destaque

**Tabela 2: Similaridade da seqüência de resíduos de aminoácidos da BmatTX-IV com seqüências de PLA<sub>2</sub>s Lys49 já caracterizadas de venenos botrópicos**

Fosfolipase A <sub>2</sub>	Espécie	% de Similaridade
BthTX-I	<i>B. jararacussu</i>	79%
Bnsp-7	<i>B. pauloensis</i>	78%
Piratoxin-Li	<i>B. pirajai</i>	79%
BbTX-II	<i>B. brazili</i>	79%
Miotoxin	<i>B. asper</i>	78%
MjTX-I	<i>B. moojeni</i>	77%

### 4.3 Avaliação da atividade antiparasitária do veneno e da BmatTX-IV

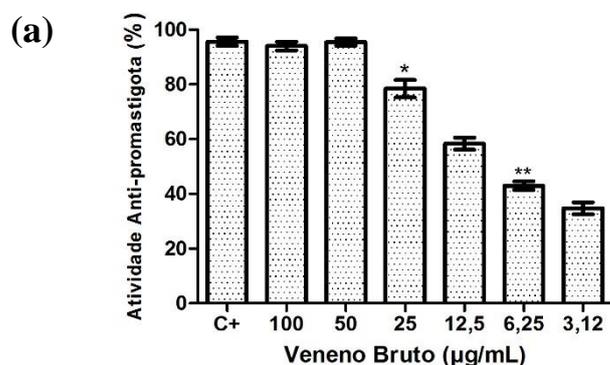
Foram desenvolvidos testes para avaliar a potencial atividade contra formas promastigotas de *L. infantum* (Figura 17) e contra formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 18). Pode-se observar que o veneno não apresenta diferença significativa com o controle positivo nas concentrações de 100 e 50 µg/mL contra *L. infantum*, enquanto que a BmatTX-IV, embora apresenta atividade menor que o controle positivo, apresenta aproximadamente 40% de atividade leishmanicida na concentração de 100 µg/mL

Por outro lado, nos testes desenvolvidos contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* (Figura 19), pode-se observar diferença significativa da atividade tripanocida em relação ao controle positivo a partir da concentração 6,25 µg/mL, enquanto que a BmatTX-IV, na concentração 100 µg/mL apresenta 40% de atividade tripanocida.

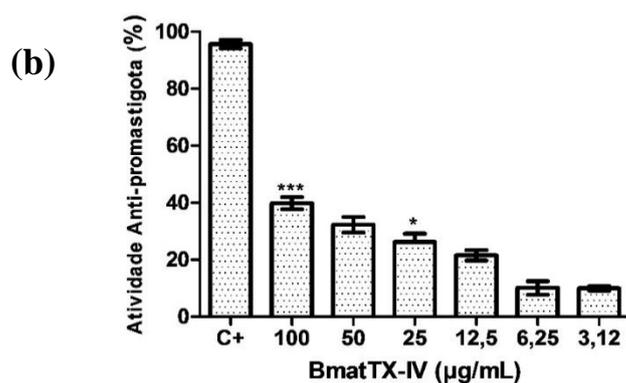
A avaliação de citotoxicidade contra fibroblastos murinos NCTC929 (Figura 20), apresentando diferenças estatisticamente significantes em comparação ao controle de crescimento, evidenciando alta toxicidade do veneno em todas as concentrações testadas, enquanto que a proteína isolada apresenta uma redução significativa de viabilidade até a concentração de 12,5 µg/mL.

### 4.3.1 Avaliação da atividade leishmanicida contra formas promastigotas de *Leishmania infantum*

Figura 14: Atividade leishmanicida *in vitro*



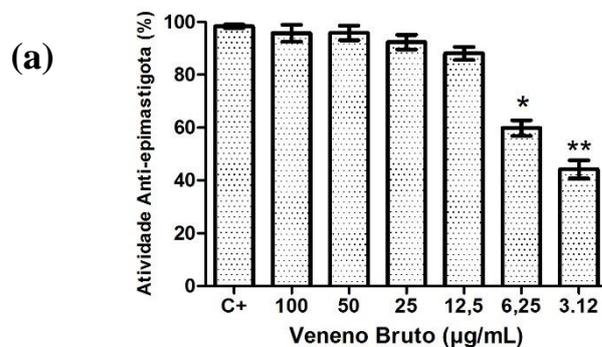
Atividade leishmanicida do veneno contra formas promastigotas de *L. infantum*. O fármaco de referência Pentamidina na concentração 100 µg/mL foi utilizado como controle positivo. Parasitas incubados com médio de cultura foram considerados como controle de crescimento. Para a análise estatística foram utilizados os testes ANOVA e o teste Turkey. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Controle Vs 25 µg/mL: \*p <0,05. Controle Vs 6,25µg/mL: \*\*p <0,01



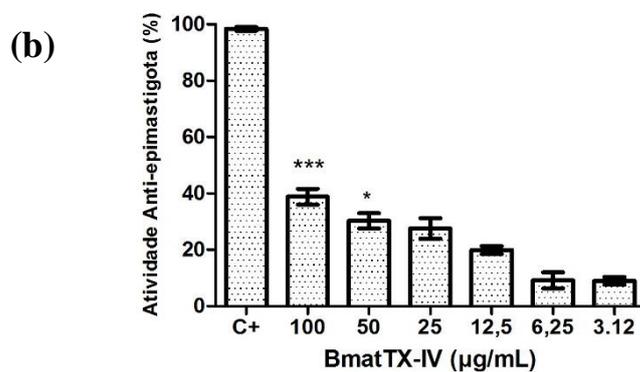
Atividade leishmanicida da BmatTX-IV contra formas promastigotas de *L. infantum*. O fármaco de referência Pentamidina na concentração 100 µg/mL foi utilizado como controle positivo. Parasitas incubados com médio de cultura foram considerados como controle de crescimento. Para a análise estatística foram utilizados os testes ANOVA e o teste Turkey. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Controle Vs 100 µg/mL: \*\*\*p <0,001. Concentração de 100 Vs 25µg/mL: \*p <0,05.

### 4.3.2 Atividade tripanocida *in vitro* contra formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*

Figura 15: Atividade tripanocida *in vitro*



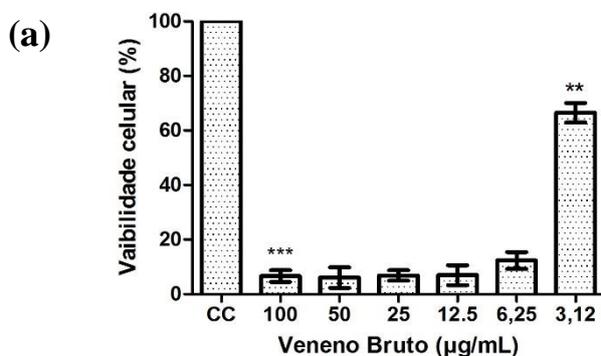
Atividade tripanocida do veneno contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. O fármaco de referência Benzonidazol na concentração 100 µg/mL foi utilizado como controle positivo. Parasitas incubados com médio de cultura foram considerados como controle de crescimento. Para a análise estatística foram utilizados os testes ANOVA e o teste Turkey. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Controle Vs 100 µg/mL: \* $p < 6,25$ . Controle Vs 100 Vs 3,12 µg/mL: \*\* $p < 0,01$ .



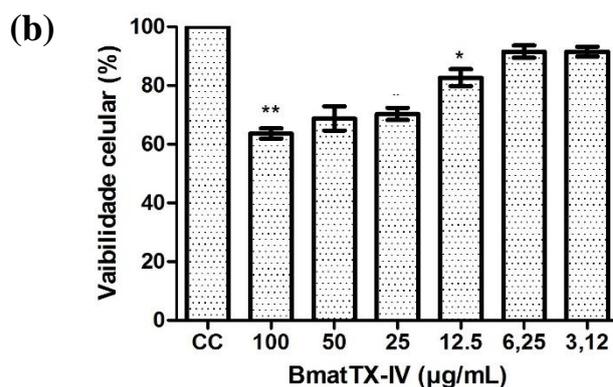
Atividade tripanocida do veneno contra formas epimastigotas de *T. cruzi*. O fármaco de referência Benzonidazol na concentração 100 µg/mL foi utilizado como controle positivo. Parasitas incubados com médio de cultura foram considerados como controle de crescimento. Para a análise estatística foram utilizados os testes ANOVA e o teste Turkey. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Controle Vs 100 µg/mL: \*\*\* $p < 0,001$ . Concentração

### 4.3.3 Citotoxicidade *in vitro* contra fibroblastos NCTC 929

Figura 16: Citotoxicidade *in vitro*



Atividade citotóxica do veneno contra fibroblastos NCTC 929. Células incubadas com médio de cultura foram considerados como controle de crescimento. Para a análise estatística foram utilizados os testes ANOVA e o teste Turkey. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Controle Vs 100 µg/mL: \*\*\* $p < 0,001$ . Controle Vs 3,12 µg/mL: \*\* $p < 0,01$ .



Atividade citotóxica da BmatTX-IV contra fibroblastos NCTC 929. Células incubadas com médio de cultura foram considerados como controle de crescimento. Para a análise estatística foram utilizados os testes ANOVA e o teste Turkey. Os resultados são expressos como média e desvio padrão. Controle Vs 100µg/mL: \*\* $p < 0,01$ . Controle Vs 12,5 µg/mL: \* $p < 0,05$ .

## 5 DISCUSSÃO

### 5.1 Isolamento e caracterização físico-química

Na atualidade, diversas estratégias em proteômica vem sendo desenvolvidas com a finalidade de obter maior precisão nas análises de amostras complexas, sendo muitas delas utilizadas nos processos para a caracterização de venenos de serpentes. Neste sentido, as pesquisas com venenos têm sido constantemente reforçadas, devido aos avanços nestas técnicas e surgimento de ferramentas mais precisas (GEORGIEVA et al., 2008; CALVETE, 2011; LOMONTE et al., 2014).

A caracterização dos componentes dos venenos de serpentes pode fornecer informações relevantes vinculadas a diversas linhas de pesquisa, e neste contexto, no presente trabalho foi isolada uma PLA<sub>2</sub> Lys49 proveniente do veneno de exemplares de *B. matogrossensis* mantidos em cativeiro em um serpentiário do Paraguai.

Vale ressaltar que a seleção da metodologia adequada é crucial para desenvolver de maneira eficiente o processo de purificação de proteínas, pois viabiliza posteriores análises estruturais, funcionais e biológicas. É importante mencionar que as diferentes características físico-químicas e funcionais da proteína de interesse devem ser consideradas no momento de realizar as técnicas de isolamento. Atualmente, numerosos avanços nas metodologias e equipamentos têm contribuído com os processos de purificação, permitindo a obtenção de amostras com alto grau de pureza e com a conservação das diversas propriedades funcionais das moléculas de interesse (KINI, 2003; STÁBELI et al., 2012).

A técnica de cromatografia líquida é um dos métodos mais versáteis para a separação de proteínas e peptídeos de origem natural ou sintético, pois fornece alta resolução na separação de proteínas a partir de misturas complexas. No contexto deste trabalho, o primeiro passo realizado para o fracionamento do veneno de *B. matogrossensis*, com a finalidade de isolar a BmatTX-IV, foi a cromatografia de troca iônica, especificamente a cromatografia de troca catiônica, utilizando a coluna com a resina CM-Sepharose.

No perfil cromatográfico na figura 8, observou-se que no mencionado passo cromatográfico foi possível identificar 8 frações, as quais foram desidratadas e submetidas a eletroforese monodimensional 12,5% (Figura 9), onde identificou-se a massa molecular aparente das proteínas presentes nas frações. Na primeira linha observa-se o padrão de massa

molecular, e na linha 7 uma banda principal, a qual apresenta massa molecular aproximada de 14 kDa, compatível com a massa molecular das PLA<sub>2</sub>s. Sendo assim, esta fração foi selecionada para os posteriores passos cromatográficos.

A cromatografia de troca iônica explora as diferenças no sinal e magnitude da carga elétrica líquida das proteínas em um pH determinado. Esta técnica baseia-se na interação entre as cargas das moléculas, presentes na fase móvel (Tampão AMBIC pH 8,0) com a fase estacionária trocadora de cátions, a resina de CM Sepharose, sendo desta forma possível separar moléculas, que apresentem pequenas diferenças nas suas propriedades de carga (RUEDA, 2009; NELSON; COX, 2011; MORAES et al., 2013).

Tendo em vista o ponto isoelétrico da proteína de interesse, e considerando o gradiente crescente do AMBIC, as proteínas ligadas na fase estacionária tendem a se dissociar da resina, e a BmatTX-IV, sendo uma PLA<sub>2</sub> básica, é eluída nos últimos picos da cromatografia, neste caso, no pico 7.

Na literatura encontram-se disponíveis diversos trabalhos, onde é possível observar que a utilização da cromatografia de troca catiônica é uma técnica muito eficiente para a purificação das fosfolipases A<sub>2</sub> dos venenos das serpentes do gênero *Bothrops*. O processo de troca de íons não interfere nas atividades das fosfolipases, mantendo-se o mesmo padrão de expressão das atividades biológicas. As MjTX-I e MjTX-II, PLA<sub>2</sub>s básicas de *B. moojeni* foram isoladas mediante aplicação desta técnica (SOARES et al., 1998; SOARES et al., 2000).

A utilização deste processo também apresentou um alto rendimento no isolamento, de duas fosfolipases básicas de *Bothrops brazili*, as quais foram denominadas MTX-I e MTX-II (COSTA et al., 2008). Outro estudo, reporta uma análise cromatográfica comparativa dos venenos de serpentes do gênero *Bothrops*, identificando a presença das PLA<sub>2</sub>s básicas miotóxicas, além de demonstrar a eficiência na purificação destas enzimas mediante a cromatografia de troca catiônica (ANDRIÃO-ESCARSO et al., 2000).

A combinação desta metodologia com outras técnicas cromatográficas, também pode ser uma alternativa válida nos processos de isolamento. Vários trabalhos desenvolvidos sugerem uma alta eficiência na utilização da cromatografia de troca catiônica, seguida por uma cromatografia de fase reversa, obtendo-se desta maneira, proteínas com elevado grau de pureza (MOURA et al., 2014; PONCE-SOTO et al., 2010; COSTA TORRES et al., 2010).

Por outro lado, a cromatografia de fase reversa é uma técnica que apresenta uma alta capacidade para a purificação de moléculas, sendo uma ferramenta essencial nos processos de isolamento e análise de proteínas e peptídeos. Nesta técnica, os componentes da amostra são

separados pela afinidade à matriz da resina, que apresenta alta hidrofobicidade. Em virtude das propriedades físico químicas da acetonitrila (uns dos solventes mais amplamente utilizado para isolamento de proteínas), utilizada para eluição das moléculas adsorvidas na matriz, é possível obter alta resolução de picos cromatográficos, permitindo uma grande precisão no isolamento, sendo capaz de separar componentes com mínimas diferenças na hidrofobicidade, e considerando isto, a técnica é utilizada como uma das etapas com maior grau de resolução nos processos de purificação. A utilização da cromatografia de fase reversa pode representar diversas vantagens, como o uso de fases móveis menos tóxicas e de um custo mais baixo, fases estacionárias mais estáveis, uma análise mais rápida e boa reprodutibilidade (COLLINS et al., 2006; JANSON, 2011; STÁBELI et al., 2012).

Baseado nesta informação, no presente trabalho optou-se por realizar um segundo passo cromatográfico, uma cromatografia de fase reversa em coluna C18 (25 x 0,45 cm – Discovery), onde a fração 7, proveniente da cromatografia de troca catiônica foi submetida ao mencionado procedimento, onde obteve-se a BmatTX-IV no pico de maior intensidade (Figura 11). Adicionalmente, visando eliminar possíveis contaminantes e obter um maior grau de pureza no isolamento da proteína para os posteriores experimentos de caracterização, a fração principal foi submetida a uma recromatografia nas mesmas condições (Figura 12). Considerando que frequentemente, as proteínas são eluídas utilizando um gradiente de solvente, neste caso a concentração da acetonitrila necessária registrada para a dessorção da BmatTX-IV, foi de aproximadamente 38%. A análise em SDS PAGE 12,5%, confirmou a presença de uma banda com uma proteína de massa molecular aparente de 14 kDa (Figura 13).

Moura e colaboradores (2014), isolaram três fosfolipases básicas do veneno de exemplares de *B. matogrossensis* do Brasil, sendo duas PLA<sub>2</sub>s cataliticamente inativas (BmatTX-I e BmatTX-II), enquanto que a BmatTX-III, apresentou atividade enzimática. Os autores também optaram por utilizar a combinação de uma cromatografia de troca catiônica em coluna CM-Sepharose, e posteriormente uma cromatografia de fase reversa. Considerando o perfil cromatográfico descrito pelos autores, pode-se observar que as três fosfolipases identificadas na cromatografia de fase reversa, são provenientes de apenas uma fração da cromatografia de troca catiônica, confirmando a presença de numerosas isoformas de fosfolipases no veneno de *B. matogrossensis*. Observa-se também, a variabilidade no perfil cromatográfico dos venenos de *B. matogrossensis* provenientes do Brasil, em relação ao perfil cromatográfico do veneno de indivíduos da mesma espécie provenientes do Paraguai.

Os venenos de serpentes de origem geográficas distintas, podem sofrer alterações qualitativas e quantitativas na sua composição, motivo pelo qual, é de grande importância a caracterização dos componentes do veneno de diferentes regiões geográficas. As variações nos perfis toxicológicos dos venenos podem apresentar manifestações clínicas diferentes, e esta informação é relevante no momento de desenvolver os soros antiofídicos (ALAPE-GIRÓN et al., 2008; LOMONTE et al., 2014).

Visando confirmar a pureza, o ponto isoelétrico (*pI*) e a massa molecular exata da BmatTX-IV, foi realizada a eletroforese Bi-dimensional, seguida por espectrometria de massa. Os resultados obtidos, a partir destes experimentos, são: o valor de *pI* 9,3, e massa molecular de 13.554,81 Da.

Com diversos objetivos, foram isoladas e caracterizadas uma grande quantidade de fosfolipases básicas cataliticamente inativas, e encontram-se disponíveis na literatura as características físico-químicas, estruturais e biológicas destas proteínas. Em relação, aos resultados descritos acima, especificamente a massa molecular e o *pI*, pode-se observar a compatibilidade destes dados em relação a outras PLA<sub>2</sub>s descritas (Tabela 3)

**Tabela 3: Fosfolipases A<sub>2</sub> básicas isoladas de distintas espécies de serpentes com suas respectivas massas moleculares e *pI***

<b>Espécie</b>	<b>PLA<sub>2</sub></b>	<b>MM</b>	<b><i>pI</i></b>
<i>A. bilineatus</i> <sup>1</sup>	PLA <sub>2</sub> -I	≈14,0 kDa	8,77
<i>B. alternatus</i> <sup>2</sup>	BaTX	13,89 kDa	8,63
<i>B. asper</i> <sup>3</sup>	MTX-1, MTX-II	14,1 kDa, 14,2 kDa	8,1-8,3
<i>B. atrox</i> <sup>4</sup>	MTX-III	14,2kDa,	
<i>B. atrox</i> <sup>5</sup>	BaPLA <sub>2</sub> -I	≈ 15,0 kDa	9,1
<i>B. atrox</i> <sup>5</sup>	Miotoxina I	13,8 kDa	8,9
<i>B. brazili</i> <sup>6</sup>	BbTX-II, BbTX-III	13,68 kDa, 13,8 kDa	8,7 e 8,4
<i>B. insularis</i> <sup>7</sup>	BiPLA	13,98 kDa	8,6
<i>B. mattogrossensis</i> <sup>8</sup>	BmatTX-I, BmatTX-II	13,3 kDa, 13,6 kDa,	≈ 10, ≈ 10,
	BmatTX-III	13,6 kDa	≈ 10
Brasil			
<i>B. marajoensis</i> <sup>9</sup>	Bmje-9	13,6 kDa	8,5
<i>B. moojeni</i> <sup>10</sup>	MjTX-I	13,4 kDa	8,2
<i>B. moojeni</i> <sup>11</sup>	MjTX-II	≈14,0 kDa	8,2
<i>B. mattogrossensis</i> <sup>12</sup>	BmatTX-IV	13,5 kDa	9,3
Paraguai			

Referências: 1: TOSHIKI et al., 1993. 2: PONCE-SOTO et al., 2007. 3: RUEDA, A (2009). 4: KANASHIRO et al., 2002. 5: NUÑEZ et al., 2004. 6: HUANCAUHUIRE-VEGA et al (2009). 7:

MACHADO BRAGA et al., 2008. 8: MOURA et al., 2014. 9 GALBIATTI et al., 2012. 10: SOARES et al., 2000. 11: SOARES et al., 1998. 12: Presente trabalho.

## 5.2 Caracterização estrutural parcial

Mediante a combinação de duas técnicas de sequenciamento, foi possível identificar 81 resíduos de aminoácidos da proteína. Vale ressaltar, que foi observado a presença do resíduo do aminoácido lisina na posição 49, confirmando que a proteína isolada pertence ao grupo de PLA<sub>2</sub>s homólogas.

No alinhamento múltiplo com as PLA<sub>2</sub>s isoladas por Moura e colaboradores (2014), foi possível determinar que a proteína isolada neste trabalho, representa uma fosfolipase inédita, a qual foi denominada BmatTX-IV. Neste alinhamento, comparando a BmatTX-IV com as sequências de resíduos de aminoácidos das fosfolipases A<sub>2</sub> cataliticamente inativas (BmatTX-I e a BmatTX-II), inicialmente com a BmatTX-I, observa-se 98% de similaridade. Este fato é devido a substituição do resíduo de histidina na posição 34 da BmatTX-I, por um resíduo de arginina na mesma posição na sequência da BmatTX-IV. Por outro lado, comparando-se os 28 resíduos de aminoácidos da BmatTX-II, com os resíduos da BmatTX-IV, observa-se 90% de similaridade, devido a substituição Val3→Phe3, na Hélice 1 da região N-terminal, assim como as substituições na região da hélice curta: Val18→Ala18 e Thr19→Gln19. Embora, as mencionadas diferenças possam representar alterações na estrutura primária da proteína, é necessária a informação sobre a sequência completa para afirmar se estas substituições, podem causar modificações ao nível estrutural e funcional da proteína. Comparando-se a sequência da BmatTX-IV, com a sequência da BmatTX-III (uma PLA<sub>2</sub> enzimaticamente ativa), é possível observar um grau de similaridade menor (76%).

Por outro lado, também foi realizado o alinhamento múltiplo com sequências de resíduos de PLA<sub>2</sub>s caracterizadas previamente. Pode-se observar alto grau de similaridade, com outras PLA<sub>2</sub>s Lys49 de venenos botrópicos (Tabela 2).

Segundo a numeração dos resíduos de aminoácidos proposto por Renetseder e colaboradores (1985), pode-se considerar que os resíduos 1-SLVELGKMILQE-12 formam parte da Hélice 1, correspondente a região N-terminal, onde observa-se resíduos conservados em PLA<sub>2</sub>s homólogas, como a leucina na posição 5 e a glutamina na posição 11. Posteriormente, os resíduos 13-TGKNPV-18 formam parte da hélice curta. O *loop* ligante de cálcio, é formado pelos resíduos 25-GCNCGVLGRG-34, sendo possível observar que os

resíduos de Gly30 e Gly32 estão conservados. Sugere-se que, a substituição Tyr28→Asn28 pode interferir na perda de atividade catalítica destas proteínas.

Além do mencionado, outros resíduos de aminoácidos são altamente conservados nas PLA<sub>2</sub>s homólogas, como a arginina na posição 34, a lisina na posição 80 e leucina na posição 92 (ANGULO et al., 2002; DOS SANTOS et al., 2009). Também é possível observar a presença de 11 dos 14 resíduos de cisteína, os quais são responsáveis pela formação das pontes dissulfeto.

Embora a BmatTX-IV seja uma PLA<sub>2</sub> cataliticamente inativa, como demonstra a sequência obtida, pode-se observar que o sítio catalítico formado pelos resíduos His48, Tyr52 e Asp99 permanece conservado.

### 5.3 Avaliação da potencial atividade antiparasitária e da citotoxicidade *in vitro*

Em colaboração com o Laboratório CEDIC, no Assunção-Paraguai, foram realizados os testes de atividade antiparasitária e citotoxicidade.

As amostras foram transportadas, com a autorização fornecida pela Secretaria del Ambiente, com sede em Assunção-Paraguai (Autorização N° 01/14, *Secretaria del Ambiente*, SEAM-Paraguai), seguindo as normas do “Termo de responsabilidade de amostra de componente de patrimônio genético” (documentos em anexo).

#### 5.3.1 Atividade Leishmanicida *in vitro*

Com o objetivo de quantificar a atividade antiparasitária produzida pelo veneno e a toxina isolada, nas formas promastigotas de *Leishmania infantum*, neste experimento foi utilizada a metodologia proposta por Rolón e colaboradores (2006), com modificações para os parasitas do gênero *Leishmania* (ROLÓN et al., 2009). A mencionada metodologia baseia-se na detecção de mudanças colorimétricas, que são causadas pela oxidação e redução do corante Resazurina, que é um indicador do metabolismo celular. Este corante permite a quantificação de viabilidade ou citotoxicidade sobre diferentes tipos de células, demonstrando eficiência, pois apresenta características como baixo custo, rapidez e boa reprodutibilidade (ROLÓN et al., 2006; ESCOBAR et al., 2010)

Neste experimento, optou-se por realizar testes contra as formas promastigotas de *L. infantum*, que foram incubadas em diferentes concentrações do veneno e da BmatTX-IV, durante 48 horas. Posteriormente, realizou-se a leitura da absorbância, sendo observado

aproximadamente 90% de atividade anti-promastigota do veneno, nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, respectivamente (Figura 17a). Na Figura 17b, pode-se observar os valores aproximados a 40 e 35% de atividade da BmatTX-IV, nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, respectivamente.

Foi reportado que o veneno e seus componentes poderiam estar vinculados com diversos processos que envolvem morte celular, inibição de crescimento e outras alterações em várias espécies do gênero *Leishmania*. O veneno de *B. moojeni* e frações, são capazes de reduzir a viabilidade de formas promastigotas de *L. braziliensis* e *L. amazonensis*, além de causar alterações no padrão de expressão das proteínas dos parasitas. Estas alterações poderiam estar vinculadas com a redução de viabilidade celular, assim como a redução de infectividade (CASTILHOS et al., 2011).

Stábili e colaboradores (2006) desenvolveram testes comparativos com diferentes cepas de *Leishmania* spp., avaliando a atividade de uma PLA<sub>2</sub> Lys49 denominada MjTX-II, isolada do veneno de *B. moojeni*. Os autores demonstram que esta toxina, na concentração de 75 µg/mL é capaz de reduzir em 60% a viabilidade celular das formas promastigotas de *L. donovani*, enquanto que *L. braziliensis* na mesma concentração, demonstrou menos susceptibilidade a MjTX-II, com uma redução de 30%. Resultados semelhantes foram obtidos com a BmatTX-IV, já que esta toxina nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, foi possível observar a atividade antiparasitária de 40 e 35%, respectivamente.

Por outro lado, Costa e colaboradores (2010) determinaram que a LAO isolada do veneno de *B. marajoensis*, foi capaz de inibir o crescimento de promastigotas de *L. chagasi* e *L. amazonensis*. Entretanto, fosfolipases A<sub>2</sub> isoladas do mesmo veneno, não apresentaram resultados positivos na inibição do crescimento dos parasitas.

A variabilidade destes resultados demonstra a importância da caracterização das diferentes toxinas de várias espécies de serpentes. Embora possam pertencer à mesma família de proteínas, as toxinas podem apresentar uma grande variabilidade de manifestações farmacológicas, o que também pode ser observado nos resultados de avaliação do potencial antiparasitário das toxinas.

Neste contexto, um estudo comparativo da atividade leishmanicida dos venenos de três subespécies *Crotalus durissus* (*Crotalus durissus terrificus*, *C. d. cascavella*, e *C. d. collinetus*) contra promastigotas de *L. amazonensis*, realizado por Passero e colaboradores (2007), apresentou resultados distintos, sendo que os venenos de *C. d. terrificus* e *C. d. cascavella*, apresentaram maior atividade antiparasitária em comparação ao veneno de *C. d. collineatus*. Considerando a variabilidade existente no perfil proteico dos venenos das

diferentes subespécies de *Crotalus durissus*, os autores concluem que as diferenças dos resultados de atividade leishmanicida, podem estar relacionados ao mencionado fato.

Outra proteína com atividade leishmanicida comprovada, é a BnSP-7 uma PLA<sub>2</sub> cataliticamente inativa, isolada do veneno de *B. pauloensis*. Esta toxina, é capaz de inibir o crescimento de formas promastigotas em aproximadamente 70%, na concentração de 200 µg/mL. Também foi demonstrado que a BnSP-7, pode retardar o processo de diferenciação amastigota-promastigota, além de interferir com a capacidade de infecção do parasita (NUNES et al., 2013).

No presente trabalho, durante a avaliação da atividade antiparasitária do veneno de *B. mattogrossensis* e da BmatTX-IV, optou-se por utilizar como modelo as formas promastigotas de *L. infantum*. Neste contexto Moura e colaboradores (2014), avaliaram o potencial antiparasitário do veneno de *B. mattogrossensis* e de duas fosfolipases A<sub>2</sub>, a BmatTX-I (Lys49) e a BmatTX-III (Asp49), contra promastigotas de *L. amazonensis*. Os autores observaram que o veneno foi capaz de causar morte celular em 80% das formas promastigotas de *L. amazonensis*, enquanto que no experimento realizado com as fosfolipases, apresentam resultados semelhantes aos obtidos com a BmatTX-IV, causando aproximadamente 35% de morte celular. Considerando estes resultados, é possível sugerir que os mecanismos pelos quais as PLA<sub>2</sub>s apresentam atividade antiparasitária, são independentes da atividade catalítica destas proteínas.

### 5.3.2 Atividade Tripanocida *in vitro*

Para a avaliação do potencial antiparasitário do veneno de *B. mattogrossensis* e da BmatTX-IV, optou-se por utilizar como modelo, as formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi* da cepa CL-clone B5. Testes *in vitro* utilizando o mencionado modelo, podem representar o primeiro passo para o desenvolvimento de triagens na busca de moléculas com atividade tripanocida (MUELAS-SERRANO et al., 2002; VEGA et al., 2005; ROLÓN et al., 2006).

Com a finalidade de quantificar a atividade tripanocida, foi utilizada a metodologia proposta por Vega e colaboradores (2006), a qual consiste na utilização de cepas de *Trypanosoma cruzi* transfectadas com o gene *LacZ* de *Escherichia coli*. Considerado que este gene é capaz de expressar a enzima B-galactosidase, sendo possível quantificar a atividade desta enzima mediante uma reação colorimétrica com o CPRG, conferindo uma alta sensibilidade e precisão nos testes farmacológicos (BUCKNER et al., 1996).

Neste trabalho, formas epimastigotas do parasita foram incubadas em diferentes concentrações do veneno e da proteína, durante 72 horas. Posteriormente, realizou-se a leitura no espectrofotômetro, e observou-se aproximadamente 90% de atividade anti-epimastigota do veneno, nas concentrações de 100-12,5 µg/mL (Figura 19a), enquanto que a proteína isolada, nas concentrações 100-50 µg/mL apresentou atividade de 40 e 35%, respectivamente (Figura 19ab).

A informação a respeito da atividade tripanocida de venenos de serpente e proteínas isoladas é pouco descrita, embora existam pesquisas determinando o potencial antiparasitário do veneno, experimentos realizados com toxinas, principalmente com fosfolipases são escassos. Fernández-Gómez e colaboradores (1994), demonstraram que os venenos de *Naja naja* e *Cerastes cerastes* apresentam uma significativa inibição na proliferação *in vitro* de formas epimastigotas de *T. cruzi*. Outro estudo, comprovou que o veneno de *B. jararaca* ocasiona diversas alterações ao nível estrutural nas diversas formas do parasita, causando aumento no tamanho mitocondrial e desorganização do cinetoplasto (GONÇALVES et al., 2002). Posteriormente, Deolindo e colaboradores (2010) fracionaram o veneno e testaram as diferentes frações contra formas epimastigotas de *T. cruzi*, associando a morte celular programada com a fração onde está presente a L-amino oxidase, a qual também causou a retração do citoplasma, aumento no tamanho da mitocôndria e fragmentação no DNA, características de células em apoptose.

O veneno de *Crotalus viridis viridis* também apresentou atividade contra *T. cruzi*, sendo eficiente contra formas epimastigotas, tripomastigotas e amastigotas do parasita. Adade e colaboradores (2011), relataram que o veneno da mencionada espécie ocasionou danos a nível morfológico, os quais foram confirmados mediante microscopia eletrônica, e com dados fornecidos por citometria de fluxo, sugeriram que o veneno causa morte celular necrótica em *T. cruzi*. Os autores também mencionam, que embora a IC50 em formas tripomastigotas seja menor que em epimastigotas, não existe diferença significativa entre ambos os resultados, porém o mecanismo pelo qual o veneno causa a morte celular é diferente.

Em um trabalho comparativo realizado por Castillo-Vigil e colaboradores (2008) avaliou-se o efeito tripanocida dos venenos de serpentes da Costa Rica. Os autores utilizaram como modelo diversas cepas de *T. cruzi*, nas diferentes formas do ciclo evolutivo do parasita, concluindo que a atividade antiparasitária dos venenos é dependente de vários fatores, tais como: cepa utilizada, forma do parasita, tipo de veneno, tempo de incubação do veneno com os parasitas e concentração do veneno.

Pode-se observar que o veneno de *B. matogrossensis*, testado contra as formas epimastigotas de *T. cruzi* em relação a redução da viabilidade, apresenta resultados semelhantes comparados aos trabalhos citados, mas em relação a BmatTX-IV como foi mencionado, existe pouca informação disponível na literatura, que vincula a análise da atividade antiparasitária de toxinas isoladas (especificamente de PLA<sub>2</sub>s) a partir de venenos de serpente contra *T. cruzi*.

Com a finalidade de realizar uma comparação mais próxima, pode-se mencionar o trabalho desenvolvido por Boutrin e colaboradores (2008), onde demonstram que a bvPLA<sub>2</sub>, uma PLA<sub>2</sub> isolada do veneno da abelha *Apis mellifera*, apresentou atividade tripanocida contra *Trypanosoma brucei brucei*. Considerando que foi comprovado por Adade e colaboradores, que o veneno de *Apis mellifera* altera o crescimento, viabilidade e causa danos a nível estrutural em diversas formas de *T. cruzi*, é possível sugerir que parte destes efeitos, sejam causados pela atividade das PLA<sub>2</sub>s presentes no veneno de *A. mellifera*.

Os resultados expostos, tornam evidente o potencial antiparasitário do veneno de *B. matogrossensis*, embora exista uma notável redução na sua atividade, uma vez que os parasitas são incubados com a BmatTX-IV, sugerindo que além desta toxina, estão presentes no veneno outras moléculas que poderiam atuar em sinergia com a fosfolipase, potencializando a sua atividade.

Mora-Ovando e colaboradores (2014), relataram que baixas quantidades de PLA<sub>2</sub> Asp49, quando incubadas com as variantes Lys49, podem aumentar notavelmente a citotoxicidade *in vitro* e *in vivo*, utilizando como modelo *in vitro* a linhagem celular C2C12, e modelo *in vivo* camundongos. É importante destacar, que os mencionados testes foram desenvolvidos com células de mamíferos, motivo pelo qual não é possível afirmar que o mesmo efeito sinérgico estaria acontecendo nas células dos parasitas, sendo necessário realizar testes de citotoxicidade em células de mamíferos, assim como testes *in vivo* para determinar uma potencial seletividade das moléculas testadas.

No presente trabalho, optou-se por utilizar como modelo para os testes de citotoxicidade *in vitro*, os fibroblastos murinos da linhagem NCTC929, e para a quantificação de citotoxicidade utilizou-se a metodologia proposta por Rolón e colaboradores (2005), com modificações. Neste experimento, quando as células são incubadas com o veneno, a viabilidade celular encontra-se reduzida em 90% na maioria das concentrações testadas. Enquanto que, as células incubadas com a BmatTX-IV nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, a viabilidade celular é reduzida em 40%.

Embora amplamente descrito o potencial citotóxico do veneno de serpentes e de PLA<sub>2</sub>s, recomenda-se desenvolver estudos comparativos visando determinar seletividade das moléculas testadas. Castillo-Vigil e colaboradores (2008), demonstraram alta toxicidade do veneno das serpentes, incubando células Vero em diferentes concentrações do veneno de diversas espécies. Os autores deste trabalho relataram maior toxicidade do veneno em células Vero, comparado as formas epimastigotas de *T. cruzi* da cepa CL uma vez que são determinadas as IC<sub>50</sub> de ambos, mas quando as formas amastigotas dos parasitas são incubadas com os venenos, a IC<sub>50</sub> diminui sugerindo que existe maior seletividade para as formas amastigotas.

Por outro lado, Adade e colaboradores (2011), em um trabalho realizado com o veneno de *Crotalus viridis viridis*, foi demonstrado que a IC<sub>50</sub> capaz de causar lise e mudanças estruturais em células da linhagem LLC-MK<sub>2</sub>, é maior que a IC<sub>50</sub> para causar as mesmas alterações nas três formas de *T. cruzi*.

Neste trabalho, o veneno de *B. matto grossensis* apresenta aproximadamente 90% de citotoxicidade nas concentrações de 100-6,25 µg/mL, enquanto que a atividade antiparasitária na concentração de 6.25 µg/mL é de aproximadamente 60%, motivo pelo qual considerando os modelos utilizados nestes experimentos, não é possível afirmar que existe uma seletividade do veneno. Resultados similares são obtidos comparando-se a atividade citotóxica da BmatTX-IV, com a sua atividade contra os epimastigotas de *T. cruzi*, já que nas maiores concentrações testadas, pode-se observar uma redução da viabilidade de aproximadamente 40% em ambos modelos.

Vale mencionar que os estudos com formas promastigotas de *Leishmania infantum* e formas epimastigotas de *Trypanosoma cruzi*, são considerados como uma triagem farmacológica preliminar na busca de novas moléculas com potencial atividade antiparasitária.

Existe uma grande necessidade para o desenvolvimento de novas alternativas referentes ao tratamento de doenças causadas pelos tripanossomastídeos, e diante do exposto, considera-se que as toxinas provenientes de animais, incluindo os venenos das serpentes, são interessantes fontes para a busca de componentes que podem ser utilizados como modelos para novas estratégias terapêuticas.

## 6 CONCLUSÕES

Utilizando cromatografia de troca catiônica e posteriormente uma cromatografia de fase reversa, a partir do veneno de exemplares de *Bothrops matogrossensis* provenientes do Paraguai, foi isolada com alto grau de pureza uma nova fosfolipase A<sub>2</sub> Lys49, a qual foi denominada BmatTX-IV. A mencionada proteína apresentou massa molecular de 13.554,81 Da e ponto isoelétrico de 9,3, assim como um alto grau de similaridade com outras fosfolipases de venenos botrópicos previamente caracterizadas.

Em relação a determinação do potencial antiparasitário contra as formas promastigotas de *L. infantum* e formas epimastigotas de *T. cruzi*, tendo em conta a elevada atividade do veneno contra os modelos de parasitas testados, evidencia-se um efeito sinérgico dos diferentes componentes do veneno, já quando os parasitas são incubados com a BmatTX-IV, observou-se redução da atividade antiparasitária.

Finalmente, levando em conta os modelos testados nos diferentes experimentos *in vitro*, não é possível determinar seletividade do veneno e da BmatTX-IV em relação a atividade antiparasitária, considerando que foi possível observar elevada citotoxicidade em fibroblastos murinos, enquanto que a BmatTX-IV, nas concentrações de 100 e 50 µg/mL, apresentou citotoxicidade aproximada a 40%.

## 7 REFERÊNCIAS

ADADE, C.; CARVALHO, A. L.; TOMAZ, M.; et al. Crovirin, a Snake Venom Cysteine-Rich Secretory Protein (CRISP) with Promising Activity against *Trypanosomes* and *Leishmania*. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 10, p. 1–9, 2014.

ADADE, C. M.; CONS, B. L.; MELO, P. A.; SOUTO-PADRÓN, T. Effect of *Crotalus viridis viridis* snake venom on the ultrastructure and intracellular survival of *Trypanosoma cruzi*. **Parasitology**, v. 138, p. 46–58, 2011.

ADADE, C. M.; OLIVEIRA, I. R. S.; PAIS, J. A. R.; SOUTO-PADRÓN, T. Melittin peptide kills *Trypanosoma cruzi* parasites by inducing different cell death pathways. **Toxicon**, v. 69, p. 227–239, 2013

ALAPE-GIRÓN, A.; SANZ, L.; ESCOLANO, J.; et al. Snake venomomics of the lancehead pitviper *Bothrops asper*. Geographic, individual, and ontogenetic variations. **Journal of Proteome Research**, v. 7, n. 8, p. 3556–3571, 2008.

ANDRADE, D. V.; GOLLOB, K. J.; DUTRA, W. O. Acute Chagas Disease: New Global Challenges for an Old Neglected Disease. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 8, n. 7, p. 1–10, 2014.

ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; et al. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> in *Bothrops* snake venoms: Effect of chemical modifications on the enzymatic and pharmacological properties of bothropstoxins from *Bothrops jararacussu*. **Biochimie**, v. 82, p. 755–763, 2000.

ANGULO, Y.; et al. Structural characterization and phylogenetic relationships of myotoxin II from *Athropoides (Bothrops) nummifer* snake venom, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue. **The International Journal of Biochemistry and Cell Biology**, v.34, p. 1268-1278, 2002

ANGULO, Y.; CHAVES, E.; ALAPE, A.; et al. Isolation and characterization of a myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> from the venom of the arboreal snake *Bothriechis (Bothrops) schlegelii* from Costa Rica. **Archives of biochemistry and biophysics**, v. 339, n. 2, p. 260–266, 1997.

ANGULO, Y.; LOMONTE, B. Biochemistry and toxicology of toxins purified from the venom of the snake *Bothrops asper*. **Toxicon**, v. 54, n. 7, p. 949–957, 2009.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A<sub>2</sub>, a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827–841, 1996.

BERNARDES, C. P.; MENALDO, D. L.; CAMACHO, E.; et al. Proteomic analysis of *Bothrops pirajai* snake venom and characterization of BpirMP, a new P-I metalloproteinase. **Journal of Proteomics**, v. 80, p. 250–267, 2013.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 62, p. 325–372, 199

BERNARDES, L.; ZANI, C.; CARVALHO, I. Trypanosomatidae diseases: from the current therapy to the efficacious role of trypanothione reductase in drug discovery. **Current Medicinal Chemistry**, v. 20, n. 21, p. 2673–96, 2013.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic metalloproteinases from snake venoms. **Pharmacology and Therapeutics**, v. 62, p. 325–372, 1994.

BOUTRIN, M. C. F.; FOSTER, H. A.; PENTREATH, V. W. The effects of bee (*Apis mellifera*) venom phospholipase A<sub>2</sub> on *Trypanosoma brucei brucei* and enterobacteria. **Experimental Parasitology**, v. 119, n. 2, p. 26–251, 2008.

BUCKNER, F. S.; VERLINDE, C. L. M. J.; FLAMME, A. C. L. A.; VOORHIS, W. C. V. A N. Efficient Technique for Screening Drugs for Activity against. **Microbiology**, v. 40, n. 11, p. 2592–2597, 1996.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A<sub>2</sub> structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, p. S237–S242, 2009.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. NIH Public Access. **Phospholipase A<sub>2</sub> Biochemistry**, v. 23, n. 1, p. 1–22, 2010.

CACCIALI, P. Diversidad de anfibios y reptiles en Paraguay. **Biodiversidad Del Paraguay: Aproximaciones a Sus Realidades**. 1era ed., p.109–117, 2007. Asunción.

CACCIALI, P. **Guia para la identificación de 60 serpientes del Paraguay**. Asunción, 2009.

CACCIALI, P. **Reptiles del Paraguay: Una aproximación al estudio de su diversidad y distribución geografica**, 2010. Programa de Maestria en Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Universidad de la República. Dissertação (Mestrado).

CALDERON, L. Amazonian biodiversity: a view of drug development for Leishmaniasis and Malaria. **Journal of the Brazilian Chemical Society**, v. 20, p. 1011-1023, 2009.

CALDERON, L.; DA SILVA, L.; STABELI, R. Biodiversidade, infraestrutura universitária e burocracia: os desafios da pesquisa bioprospectiva visando o desenvolvimento sustentado da amazônica legal. **Revista de Estudos Universitários**, v. 36, p.15-41, 2010.

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, p. 739–758, 2011.

CALVETE, J. J.; JUAREZ, P.; SANZ, L. Snake venomics. Strategy and applications. **Journal of mass spectrometry**, v. 42, p. 1405–1414, 2007.

CARDOSO, F. F. **Ação de compostos vegetais sobre a atividade da Piratoxina-I ,isolada do veneno de *Bothrops pirajai*, em preparação neuromuscular de camundongos**, 2011. Universidade Estadual Paulista “Julio de Mesquita Filho”. Dissertação (Mestrado).

CARRASCO, P. A.; MATTONI, C. I.; LEYNAUD, G. C.; SCROCCHI, G. J. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae). **Zoologica Scripta**, v. 41, p. 109–124, 2012.

CARVALHO, D. D. DE; SCHMITMEIER, S.; NOVELLO, J. C.; MARKLAND, F. S. Effect of BJcuL (a lectin from the venom of the snake *Bothrops jararacussu*) on adhesion and growth of tumor and endothelial cells. **Toxicon**, v. 39, p. 1471–1476, 2001.

CASEWELL, N. R.; WÜSTER, W.; VONK, F. J.; HARRISON, R. A.; FRY, B. G. Complex cocktails: The evolutionary novelty of venoms. **Trends in Ecology and Evolution**, v. 28, p. 219–229, 2013.

CASTILHOS, P.; PEREIRA, G. .; SILVA, A.; et al. Effects of *Bothrops moojeni* venom on *Leishmania amazonensis* promastigote forms. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online)**, v. 17, n. 2, p. 150–158, 2011.

CASTILLO-VIGIL, A.; RANDALL, L.; ZELEDÓN, R.; et al. Susceptibilidad de *Trypanosoma cruzi* a diferentes venenos de serpientes de Costa Rica. **Boletín de malariología y salud ambiental**, v. XLVIII, n. 2, p. 135–144, 2008.

CHAPPUIS, F.; SUNDAR, S.; HAILU, A.; GHALIB, H.; SUMAN, RI. Visceral leishmaniasis : what are the needs for diagnosis , treatment and control ? **Nature Reviews. Microbiology**, v. 5, p. 873–882, 2007.

CHATELAIN, E. Chagas Disease Drug Discovery: Toward a New Era. **Journal of Biomolecular Screening**, v. 20, p. 22–35, 2014.

CLAYTON, J. Chagas Disease. **Nature**, 465, n.7301, p. S4-S5.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**, v. 432, n. 7019, p. 829–837, 2004.

COLLINS, C.; BRAGA, G.; BONATO, P. **Fundamentos de Cromatografia**. Editora de Unicamp, 2010.

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; OLIVEIRA, C. Z.; et al. Myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops brazili* snake venom and synthetic peptides derived from their C-terminal region: Cytotoxic effect on microorganism and tumor cells. **Peptides**, v. 29, p. 1645–1656, 2008.

COSTA TORRES, A. F.; DANTAS TAVARES, R.; TOYAMA, M.; et al. Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions : Phospholipase A<sub>2</sub> and L -amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, p. 795–804, 2010.

DA SILVA, S.; WHITE, S.; OWNBY, C. cDNA cloning and sequence analysis of a lysine-49 phospholipase A<sub>2</sub> myotoxin from *Agkistrodon contortrix laticinctus* snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 396, p. 21–31, 1996.

DA SILVA, M.T.;et al. Crystallographic and spectroscopic characterization of a molecular hinge: conformational changes in bothropstoxin I, a dimeric Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue. **Proteins**, v. 30, p. 442–454, 1998.

- DA SILVA, S. L.; ROWAN, E. G.; ALBERICIO, F.; et al. Animal Toxins and Their Advantages in Biotechnology and Pharmacology. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 2–4, 2014.
- DA SILVA, V. X.; RODRIGUES, M. T. U. Taxonomic revision of the *Bothrops neuwiedi* complex (Serpentes, Viperidae) with description of a new species. **Phyllomedusa**, v. 7, n. May 2006, p. 45–90, 2008.
- DALTRY, J.; WOLFANG, W.; ROGER, T. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v. 379, p. 537–540, 1996.
- DENNIS, E. A.; CAO, J.; HSU, Y.-H.; MAGRIOTI, V.; KOKOTOS, G. Phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: physical structure, biological function, disease implication, chemical inhibition, and therapeutic intervention. **Chemical reviews**, v. 111, p. 6130–85, 2011.
- DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Toxic acid oxidase activity present in fractions of *Bothrops jararaca* venom is responsible for the induction of programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* L -Amino. **Toxicon**, v. 56, n. 6, p. 944–955, 2010.
- DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E. J. T.; et al. Programmed cell death in *Trypanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 100, n. December 2004, p. 33–38, 2005.
- DÍAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Isolation and characterization of basic myotoxic phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops godmani* (Godman's pit viper) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 298, n. 1, p. 135–142, 1992.
- DOS SANTOS, J. I.; FERNANDES, C. A. H.; MAGRO, A. J., et al. The intriguing phospholipases A<sub>2</sub> homologues: relevant structural features on myotoxicity and catalytic inactivity. **Protein and peptide letters**, v. 16, p. 887–893, 2009.
- EDMAN, P. Method for determination of the amino acid sequence in peptides. **Acta Chemica Scandinavica**, v. 4, p. 283–293, 1950.
- ESCALANTE, T.; RUCAVADO, A.; FOX, J. W.; GUTIÉRREZ, J. M. Key events in microvascular damage induced by snake venom hemorrhagic metalloproteinases. **Journal of Proteomics**, v. 74, n. 9, p. 1781–1794, 2011.
- ESCOBAR, L.; RIVERA, A.; ARISTIZÁBAL, F. F. Estudio comparativo de los métodos de resazurina y MTT en estudios de citotoxicidad en líneas celulares tumorales humanas. **Vitae**, v. 17, p. 67–74, 2010.
- FERNANDEZ-GOMEZ, R.; ZERROUK, H.; SEBTI, F.; et al. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: Preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasites. **Toxicon**, v. 32, n. 8, p. 875–882, 1994.
- FERREIRA, S. H. A bradykinin-potentiating factor (bpf) present in the venom of *Bothrops jararaca*. **British Journal of Pharmacology and Chemotherapy**, v. 24, p. 163–169, 1965.

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Timeline of key events in snake venom metalloproteinase research. **Journal of Proteomics**, v. 72, n. 2, p. 200–209, 2009.

FRIEDERICH, C.; TU, T. Role of metals in snake venoms for hemorrhagic, esterase and proteolytic activities. **Biochemical Pharmacology**, v.20, p. 1549-1556, 1971.

GALBIATTI, C.; ROCHA, T.; RANDAZZO-MOURA, P.; et al. Pharmacological and partial biochemical characterization of Bmaj-9 isolated from *Bothrops marajoensis* snake venom. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online)**, v. 18, n. 1, p. 62–72, 2012.

GARCÍA, A.; RAIMUNDO, M.; EDUARDO, O.; et al. Prácticas de Zoología Estudio y diversidad de los Vertebrados Aves y Mamíferos. **Reduca (Biología). Serie Zoología.**, v. 5, n. 3, p. 1–26, 2012.

GEORGIEVA, D.; ARNI, R. K.; BETZEL, C. Proteome analysis of snake venom toxins: pharmacological insights. **Expert Review of Proteomics**, v. 5, p. 787–797, 2008.

GHORBAMPUR, M.; et al. Purification and partial characterization of a coagulant serine protease from the venom of the iranian snake *Agkistrodon halys*. **The Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases (Online)**, v.15, p. 411-423, 2009.

GONÇALVES, A. R.; SOARES, M. J.; SOUZA, W. DE; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, v. 88, p. 598–602, 2002.

GUIMARÃES-GOMES, V.; OLIVEIRA-CARVALHO, A. L.; INÁCIO, I. DE; et al. Cloning, characterization, and structural analysis of a C-type lectin from *Bothrops insularis* (BiL) venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 432, p. 1–11, 2004.

GUO, C.; LIU, S.; YAO, Y.; ZHANG, Q.; SUN, M. Z. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, p. 302–311, 2012.

GUTIÉRREZ, J. M.; ALBERTO PONCE-SOTO, L.; MARANGONI, S.; LOMONTE, B. Systemic and local myotoxicity induced by snake venom group II phospholipases A<sub>2</sub>: Comparison between crotoxin, crotoxin B and a Lys49 PLA<sub>2</sub> homologue. **Toxicon**, v. 51, p. 80–92, 2008.

GUTIERREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipase A<sub>2</sub> myotoxins from *Bothrops* snake venoms. **Toxicon**, v. 33, n. 11, p. 1405–1424, 1995.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A<sub>2</sub>: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, p. 27–39, 2013.

HARVEY, A. L.; BRADLEY, K. N.; COCHRAN, S. A.; et al. What can toxins tell us for drug discovery? **Toxicon**, v. 36, n. 11, p. 1635–1640, 1998.

HARVEY, A. L. Toxins and drug discovery. **Toxicon**, v. 92, p. 193–200, 2014.

HUANCAHUIRE-VEJA, S.; PONCE SOTO, L.A.; MARTINS DE SOUZA, D., MARANGONI, S. Structural and functional characterization of brazilitoxins II and III (BbTX-II and -III), two myotoxins from the venom of *Bothrops brazili* snake. **Toxicon**, v. 27, n.6, p.818-827, 2009.

JANSON, J.C. **Protein Purification**. Canada, 2011

KAYAMA, H., TAKEDA, H. The innate immune response to *Trypanosoma cruzi* infection. **Microbes and infection**, v. 12, p. 511-517, 2010.

KAYE, P.; SCOTT, P. Leishmaniasis : complexity at the host – pathogen interface. **Nature Reviews. Microbiology**, v. 9, n. 8, p. 604–615, 2011

KANASHIRO, M. M.; ESCOCARD, R. C. M. DE; PETRETSKI, J. H.; et al. Biochemical and biological properties of phospholipases A<sub>2</sub> from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochemical Pharmacology**, v. 64, p. 1179–1186, 2002.

KING, G. Venoms to Drugs: Translating Venom Peptides into Therapeutics. **Australian Biochemist**, v. 44, p. 13–16, 2013.

KING, G. F. Venoms as a platform for human drugs: translating toxins into therapeutics. **Expert Opinion on Biological Therapy**, v. 11, p. 1469–1484, 2011.

KINI, R. M. Excitement ahead: Structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. **Toxicon**, v. 42, p. 827–840, 2003.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A<sub>2</sub>. **Toxicon**, v. 27, n. 6, p. 613–635, 1989.

KOEHN, F. E.; CARTER, G. T. The evolving role of natural products in drug discovery. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 4, n. 3, p. 206–220, 2005.

KOH, C. Y.; KINI, R. M. From snake venom toxins to therapeutics - Cardiovascular examples. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 497–506, 2012.

KOH, D. C. I.; ARMUGAM, A.; JEYASEELAN, K. Snake venom components and their applications in biomedicine. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 63, n. 24, p. 3030–3041, 2006.

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

LEWIS, R. J.; GARCIA, M. L. Therapeutic potential of venom peptides. **Nature reviews. Drug discovery**, v. 2, p. 790–802, 2003.

LI, S.; WANG, J.; ZHANG, X.; et al. Proteomic characterization of two snake venoms: *Naja naja atra* and *Agkistrodon halys*. **The Biochemical Journal**, v. 384, p. 119–127, 2004.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SASA, M.; GUTIÉRREZ, J. M. The phospholipase A<sub>2</sub> homologues of snake venoms: biological activities and their possible adaptive roles. **Protein and Peptide Letters**, v. 16, p. 860–876, 2009.

LOMONTE, B.; FERNÁNDEZ, J.; SANZ, L.; et al. Venomous snakes of Costa Rica: Biological and medical implications of their venom proteomic profiles analyzed through the strategy of snake venomomics. **Journal of Proteomics**, v. 105, p. 323–339, 2014.

LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M. Phospholipases A<sub>2</sub> from viperidae snake venoms: How do they induce skeletal muscle damage? **Acta Chimica Slovenica**, v. 58, p. 647–659, 2011.

LOMONTE, B.; RANGEL, J. Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A<sub>2</sub> to non-enzymatic membrane disruptors. **Toxicon**, v. 60, p. 520–530, 2012.

MACHADO BRAGA, M. D.; COSTA MARTINS, A. M.; ALVES, C. D.; et al. Purification and renal effects of phospholipase A<sub>2</sub> isolated from *Bothrops insularis* venom. **Toxicon**, v. 51, p. 181–190, 2008.

MACÍAS-RODRÍGUEZ, E. F.; DÍAZ-CÁRDENAS, C. O.; GATICA-COLIMA, A. B.; PLENGE-TELLECHEA, L. F. Variación estacional del contenido proteico y actividad de la PLA<sub>2</sub> del veneno de *Crotalus molossus molossus* entre especímenes de origen silvestre y en cautiverio. **Acta Universitaria.**, v. 24, n. 1, p. 38–47, 2014.

MACKESSY, S. P. **Handbook of Venoms and Toxins of Reptiles**. Northern Colorado, 2010.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; et al. A new class of phospholipases A<sub>2</sub> with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 2, p. 13839–13843, 1984.

MARCHI SALVADOR, D. P. **Estudos estruturais com Lys49 Fosfolipases A<sub>2</sub> nativas e complexadas com Brometo de p-Bromofenacila**, 2008. Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”. Tese (Doutorado).

MARTÍNEZ, O.; BARRIOS, A.; PINANEZ, G. **Manual de procedimientos sobre accidentes ofídicos**. 1er ed. Asunción: Ministerio de Salud Pública y Bienestar Social, 2008.

MELGAREJO-GIMÉNEZ, A. R. **Criação e Manejo de Serpentes**. Rio de Janeiro, 2002.

MENNA-BARRETO, R.; CASTRO, S. L. DE. The double-edged sword in pathogenic trypanosomatids: The pivotal role of mitochondria in oxidative stress and bioenergetics. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–14, 2014.

MONTEIRO, C.; MONTGOMERY, C. E.; SPINA, F.; SAWAYA, R. J.; MARTINS, M. Feeding, Reproduction, and Morphology of *Bothrops matto grossensis* (Serpentes, Viperidae, Crotalinae) in the Brazilian Pantanal. **Journal of Herpetology**, v. 40, n. 3, p. 408–413, 2006.

MORAES, C.; OLIVIERA, F.; MASSON, G.; REBELLO, K. **Métodos experimentales no estudo de proteínas**. Rio de Janeiro, 2013.

MORA-OBANDO, D.; FERNÁNDEZ, J.; MONTECUCCO, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Synergism between Basic Asp49 and Lys49 Phospholipase A<sub>2</sub> Myotoxins of Viperid Snake Venom *in vitro* and *in vivo*. **PLoS ONE**, v. 9, n. 10, p. 1–11, 2014.

MOREIRA IZIDORO, L. F. **Caracterização bioquímica e funcional de uma nova L-Aminoácido Oxidase isolada da peçonha da serpente *Bothrops pirajai***, 2007. Programa de Pós Graduação em Genética e Bioquímica, Universidade Federal de Uberlândia. (Doutorado).

MORENO, C. Epidemiología clínica y laboratorial por mordeduras de serpientes en pacientes. **Revista Instituto de Medicina Tropical**, v. 6, n. 1, p. 23–27, 2011.

MOURA, A. A DE; KAYANO, A. M.; OLIVEIRA, G. A.; et al. Purification and biochemical characterization of three myotoxins from *Bothrops matto grossensis* snake venom with toxicity against *Leishmania* and tumor cells. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1–13, 2014.

MUELAS-SERRANO, S.; LE-SENNE, A.; FERNÁNDEZ-PORTILLO, C.; et al. *In vitro* and *in vivo* anti-*Trypanosoma cruzi* activity of a novel Nitro-derivative. **Memorias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 97, n. 4, p. 553–557, 2002.

MUNOS, B. Lessons from 60 years of pharmaceutical innovation. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 8, n. 12, p. 959–968, 2009.

NAUMANN, C. M.; CORONEL, M. C. **Atlas ambiental del Paraguay con fines educativos**. 1era ed. ed.Asuncion, 2008.

NDAO, M.; BEAULIEU, C.; BLACK, W. C.; et al. Reversible cysteine protease inhibitors show promise for a chagas disease cure. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, p. 1167–1178, 2014.

NELSON, D.; COX, M. **Princípios de Bioquímica de Lehninger**. 5. ed. 2011.

NOLTE, S.; CASTRO DAMASIO, D. DE; BARÉA, A. C.; et al. BJcuL, a lectin purified from *Bothrops jararacussu* venom, induces apoptosis in human gastric carcinoma cells accompanied by inhibition of cell adhesion and actin cytoskeleton disassembly. **Toxicon**, v. 59, p. 81–85, 2012.

NUNES, D.; FIGUEIRA, M. M. N. R.; LOPES, D. S.; et al. BnSP-7 toxin, a basic phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* snake venom, interferes with proliferation, ultrastructure and infectivity of *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Parasitology**, v. 140, p. 844–54, 2013.

NUNES, E. S.; SOUZA, M. A A; VAZ, A. F. M.; et al. Cytotoxic effect and apoptosis induction by *Bothrops leucurus* venom lectin on tumor cell lines. **Toxicon**, v. 59, n. 7-8, p. 667–671, 2012.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v. 44, p. 91–101, 2004.

OKUBO, B. M.; SILVA, O. N.; MIGLIOLO, L.; et al. Evaluation of an antimicrobial L-amino acid oxidase and peptide derivatives from *Bothropoides matto grossensis* pitviper venom. **PLoS ONE**, v. 7, n. 3, p. 1–10, 2012.

ORTHOLAND, J. Y.; GANESAN, A. Natural products and combinatorial chemistry: Back to the future. **Current Opinion in Chemical Biology**, v. 8, n. 3, p. 271–280, 2004.

OWNBY, C. L.; SELISTRE DE ARAUJO, H. S.; WHITE, S. P.; FLETCHER, J. E. Lysine 49 phospholipase A<sub>2</sub> proteins. **Toxicon**, v. 37, p. 411–445, 1999.

PAMMOLLI, F.; MAGAZZINI, L.; RICCABONI, M. The productivity crisis in pharmaceutical R&D. **Nature Reviews. Drug discovery**, v. 10, n. 6, p. 428–438, 2011

PASSERO, L. F. D.; TOMOKANE, T. Y.; CORBETT, C. E. P.; LAURENTI, M. D.; TOYAMA, M. H. Comparative studies of the anti-leishmanial activity of three *Crotalus durissus* spp. venoms. **Parasitology Research**, v. 101, p. 1365–1371, 2007.

PONCE-SOTO, L. A.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J. M.; et al. Structural and functional properties of BaTX, a new Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops alternatus*. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1770, p. 585–593, 2007.

PONCE-SOTO, L. A.; MARTINS-DE-SOUZA, D. Neurotoxic, myotoxic and cytolytic activities of the new basic PLA<sub>2</sub> isoforms BmjeTX-I and BmjeTX-II isolated from the *Bothrops marajoensis* (marajó lancehead) snake venom. **Protein Journal**, v. 29, p. 103–113, 2010.

RENETSEDER, R.; BRUNIE, S.; DIJKSTRA, B. W. A comparison of the crystal structure of phospholipase A<sub>2</sub> from bovine pancreas and *Crotalus atrox* venom. **Journal of Biological Chemistry**, v. 260, n. 21, p. 11627–11634, 1985.

REVEIZ, L.; NICHOLLS, S.; ADOLFO, G.; ROMERO, S.; YADON, Z. E. Interventions for American Cutaneous and Mucocutaneous Leishmaniasis: A Systematic Review Update. **PLoS ONE**, v. 8, n. 4, p. 1–14, 2013.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; et al. Geographic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venoms: Biochemical characterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology - A Molecular and Integrative Physiology**, v. 121, p. 215–222, 1998.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ESCARIO, J. A.; GÓMEZ-BARRIO, A. Development of resazurin microtiter assay for drug sensibility testing of *Trypanosoma cruzi* epimastigotes. **Parasitology Research**, v. 99, p. 103–107, 2006.

ROLÓN, M.; VEGA, C.; ROJAS DE ARIAS, A. XIX Congreso Latinoamericano de Parasitología. Utilización del sustrato Resazurina para el tamizaje farmacológico en promastigotes de *L. infantum* y *L. amazonensis*. **Anais...** p.354, 2009. Asunción.

RUEDA, A. Q. **Caracterização Funcional e Estrutural de Fosfolipases A<sub>2</sub> Isoladas da Peçanha da Serpente *Bothrops asper* do Panamá**, 2009. Programa de Pós Graduação em Toxicologia, Universidade de São Paulo. Tese (Doutorado).

SALAS, D.; FACETTI, J. **Biodiversidad del Paraguay, una aproximación a sus realidades**. 1era ed. Asunción, 2007.

SÁNCHEZ, E. E. Desintegrinas en veneno de serpientes: Un nuevo enfoque en el tratamiento de las enfermedades cardiovasculares, cancer, diabetes. **Revista de la Facultad de Medicina**, v. 27, n. 1, p. 1–6, 2004..

SARRAY, S.; BERTHET, V.; CALVETE, J. J.; et al. Lelectin, a novel C-type lectin from *Macrovipera lebetina* venom, inhibits integrin-mediated adhesion, migration and invasion of human tumour cells. **Laboratory Investigation**, v. 84, p. 573–581, 2004.

SASA, M. Diet and snake venom evolution: Can local selection alone explain intraspecific venom variation? **Toxicon**, v. 37, n. 2, p. 249–252, 1999.

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A<sub>2</sub> superfamily and its group numbering system. **Biochimica et Biophysica Acta - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1761, p. 1246–1259, 2006.

SCHUMUNIS, G., YADON, Z. Chagas disease: A Latin American health problem becoming a world health problema. **Acta Tropica**, v. 114, p. 14-21

SCOTT, D. L.; WHITE, S. P.; OTWINOWSKI, Z.; et al. Interfacial catalysis: the mechanism of phospholipase A<sub>2</sub>. **Science**, v. 250, n. 4987, p. 1541–1546, 1990.

STOCKDALE, L.; NEWTON, R. A Review of Preventative Methods against Human Leishmaniasis Infection. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 6, p. 1–15, 2013.

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

SIX, D. A; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes: classification and characterization. **Biochim. Biophys. Acta - Mol. Cell. Biol. Lipids**, v. 1488, p. 1–19, 2000.

SOARES, A M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S. H.; ANGULO, Y.; et al. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops moojeni* (Caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 373, n. 1, p. 7–15, 2000.

SOARES, A M.; GUERRA-SÁ, R.; BORJA-OLIVEIRA, C. R.; et al. Structural and functional characterization of BnSP-7, a Lys49 myotoxic phospholipase A<sub>2</sub> homologue from *Bothrops neuwiedi pauloensis* venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 378, n. 2, p. 201–209, 2000.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; et al. A rapid procedure for the isolation of the Lys 49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca)

venom: Biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, v. 36, n. 3, p. 503–514, 1998.

SOUSA, L. F.; NICOLAU, C. A.; PEIXOTO, P. S.; et al. Comparison of Phylogeny, Venom Composition and Neutralization by Antivenom in Diverse Species of *Bothrops* Complex. **PLoS Neglected Tropical Diseases**, v. 7, n. 9, p. 1–16, 2013.

STÁBELI, R. G.; AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; et al. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology - C Toxicology and Pharmacology**, v. 142, p. 371–381, 2006.

STÁBELI, R. G.; SIMÕES-SILVA, R.; KAYANO, A. M.; et al. Purification of Phospholipases A<sub>2</sub> from American Snake Venoms. **Chromatography - The Most versatile Method of Chemical Analysis.**, p. 1–34, 2012.

TIMMS RANGER, J. *Bothrops*. The ultimate Pitviper. Disponível em: <http://www.bothrops-theultimatepitviper.com/especies/especie-Bothropoides-mattogrossensis.html>, acessado em abril de 2015.

TOSHIAKI, N.; YUMIKO, K.; SATORU, Y.; et al. Isolation and characterization of phospholipase A<sub>2</sub> from *Agkistrodon bilineatus* (common cantil) venom. **International Journal of Biochemistry**, v. 25, n. 6, p. 879–884, 1993.

VERA, A. **Consulta técnica sobre accidentes con animales ponzoñosos en latinoamérica.** São Paulo, 2007.

VERA, A.; PÁEZ, M.; GAMARRA DE CÁCERES, G. Caracterización Epidemiológica de los accidentes ofídicos , Paraguay 2004. **Memorias del Instituto de Investigaciones en Ciencias de la Salud.**, v. 2, n. 1, p. 20–24, 2006.

ZHANG, L., FALLA, T.J. Cosmeceuticals and peptides. **Clinics in Dermatology**, v.27, p.485–494, 2009

## 8 ANEXOS

### 8.1 Termo de responsabilidade de amostra de componente de patrimônio genético



**TERMO DE RESPONSABILIDADE PARA TRANSPORTE DE AMOSTRA DE COMPONENTE DO PATRIMÔNIO GENÉTICO**

**Exclusivo para amostra usada em projeto de pesquisa sem potencial de uso econômico, que não requira depósito definitivo da amostra ou parte da mesma na instituição onde será realizada a pesquisa**

O Termo de Responsabilidade para Transporte de Amostra de Componente do Patrimônio Genético foi instituído para controlar o transporte de amostras de patrimônio genético, existentes em condição *in situ*, no território nacional, na plataforma continental e na zona econômica exclusiva, mantidas em condição *in situ*, destinadas a instituições de pesquisa nacionais e de outros países, com base nas seguintes premissas:

- o reconhecimento de que o intercâmbio do patrimônio genético realizado entre instituições de pesquisa e desenvolvimento nas áreas biológicas e afins, sediadas no Brasil e no exterior, é fundamental para o avanço do conhecimento sobre a biodiversidade brasileira; e
- a necessidade de garantir o cumprimento do disposto na Convenção sobre a Diversidade Biológica – CDB, em especial, a soberania nacional sobre a biodiversidade, o consentimento prévio fundamentado e a repartição de benefícios decorrentes do uso do patrimônio genético.

**Instituição responsável pela amostra**  
 Nome: FIOCRUZ Rondônia, Fundação Oswaldo Cruz  
 Sigla: FIOCRUZ  
 CNPJ: 337.810.550/0001-26

**Representante Legal**  
 Nome: Manuela da Silva  
 CPF: 123.661.178-09  
 Identidade (nº e órgão emissor): 21257128-3 DETRAN-RJ  
 Cargo: Assessora da Vice-Presidência de Pesquisa e Laboratórios de Referência  
 Ato que delega competência:

**Projeto de Pesquisa**  
 Pesquisador responsável pelo projeto e pelas amostras a serem utilizadas no projeto: Leonardo de Azevedo Calderon

Título do projeto de pesquisa: Caracterização da composição molecular de venenos, secreções, tecidos e fluidos de animais vertebrados e invertebrados visando a identificação de bioativos úteis para o desenvolvimento prótipos para saúde humana

A instituição remetente e o pesquisador responsável pelo desenvolvimento do projeto acima especificado, considerando o disposto na Convenção sobre a Diversidade Biológica, na Medida Provisória nº 2.186-16, de 23 de agosto de 2001, no Decreto nº 3.945, de 26 de setembro de 2001, alterado pelo Decreto nº 4.946, de 31 de dezembro de 2003, e na Resolução nº 15, de 27 de maio de 2004, do Conselho de Gestão do Patrimônio Genético, comprometem-se a utilizar as amostras do patrimônio genético a serem acessadas no projeto de acordo com as seguintes condições:

1. O material transportado deverá ser utilizado para o desenvolvimento de pesquisas sem potencial de uso econômico, em estrita observância ao exposto no projeto acima especificado.
2. Caso seja identificado potencial de uso econômico de produto ou processo, passível ou não de proteção intelectual, originado de amostra do componente do patrimônio genético remetido com base neste Termo, a instituição responsável pela amostra obriga-se a comunicar o fato ao Conselho de Gestão do Patrimônio Genético ou a instituição por este credenciada nos termos do art. 11, inciso IV, alínea "e", da Medida Provisória nº 2.186-16, de 2001, sendo vedado o prosseguimento da atividade correspondente relativa ao potencial identificado sem a observância ao disposto na

1ª Via (CNPq) - 2ª Via (pesquisador responsável) - 3ª Via (instituição à qual o pesquisador está vinculado)



legislação, em especial, a formalização do Contrato de Utilização do Patrimônio Genético e de Repartição de Benefícios.

3. Qualquer publicação advinda de utilização ou de estudo de amostra de componente do patrimônio genético a ser transportada deverá reconhecer expressamente a origem do material, e conter créditos à instituição remetente, devendo, ainda, ser enviado exemplar da referida publicação à instituição responsável.
4. O pesquisador responsável pela pesquisa compromete-se a não transferir as amostras transportadas a terceiros e, ao término da pesquisa, destruir ou devolver o material que não tenha sido completamente utilizado no desenvolvimento do projeto.
5. O pesquisador responsável pela pesquisa compromete-se a avisar à instituição onde será processada ou analisada a amostra que eventuais subamostras e seus derivados que, inadvertidamente, permaneçam na instituição deverão ser destruídos.

Por concordarem com todas as condições acima expostas, assinam o presente Termo em 3 (três) vias, de igual teor e forma, para um só efeito legal, o pesquisador responsável pelo desenvolvimento do projeto de pesquisa, o representante da instituição responsável pela amostra, assim como o curador responsável pela coleção científica, quando for o caso.

Brasília, Porto Velho, 04 de outubro de 2013

Leonardo de Azevedo Calderon  
Pesquisador Coordenador do Projeto

Manuela da Silva  
assinatura do representante da instituição responsável

Manuela da Silva  
Mat. 1257527  
Assessora  
de Planejamento de Pesquisa e  
Laboratório de Resiliência (OCPLR)  
Laboratório de Amostras

Jorge Javier Alfonso Ruiz Diaz  
assinatura do pesquisador responsável pelo transporte

## 8.2 Registro Nacional de Vida Silvestre



Nº 137963

**REGISTRO NACIONAL DE VIDA SILVESTRE  
CONSTANCIA DE INSCRIPCION**

LOCAL DE INSCRIPCIÓN: *SECRETARIA DEL AMBIENTE.-*

USUARIO: **JORGE JAVIER ALFONSO RUIZ DÍAZ.**

DOC. Nº: **3.989.781.-**



RNVS Nº: **1494**

SE REGISTRA COMO: **INVESTIGADOR – COLECTOR CIENTÍFICO.**

FECHA DE EMISIÓN: **05/12/2013.-**




**LIC. MARTHA MOLTE, Directora**  
Dirección de Vida Silvestre

**OBSERVACION:** Esta constancia no autoriza actividad alguna relacionada con la Vida Silvestre. Para lo mencionado se solicitara en la Secretaría del Ambiente, la cual podría expedir los permisos correspondientes de acuerdo a la Ley 96/92 "DE VIDA SILVESTRE" y a la Ley 1561/2.000.

HOJA DE SEGURIDAD Nº 137.963


## 8.3 Permiso de transporte de especímenes


**SEAM**  
 SECRETARÍA DEL AMBIENTE  
 PARAGUAY

N° 138000

**PERMISO DE ENVIO DE ESPECIMENES**  
Permiso de envío de especímenes conforme a la Ley 6091 "DE VIDA SILVESTRE"

Fecha de emisión: 15/01/2014    Vencimiento: 15/01/2015 <small>Invalído con raspaduras y tachaduras</small>	
Solicitante: Jorge Alfonso <small>(Nombre y Apellido)</small>	
Destino de los especímenes: Porto Velho Rondonia -Centro de estudios de Biomoléculas Aplicadas a Saúde-Cebida florenz Rondonia -Fundacao Oswaldo Cruz <small>(País-Institución)</small>	
<b>DATOS DE LOS ESPECÍMENES</b>	
<b>Veneno</b>	
PERMISO N° 01/14	
A. Nombre Científico(genero, especie, orden) del animal o planta B. Nombre común del animal o planta - Familia.	Cantidad
1. <i>Crotalus</i> sp	N°
2. <i>Bothrops matogrossensis</i>	Letras: Veneno: Bulto
3. <i>Bothrops diporus</i>	N°
4.	Letras: Veneno: Bulto
5.	N°
6.	Letras:
7.	N°
8.	Letras:
9.	N°
10.	Letras:
11.	N°
12.	Letras:

  
 RENILDA DURE, Directora  
 DGPCB

Hoja de Seguridad N° 138000