



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS
PROGRAMA MULTI-INSTITUCIONAL DE PÓS GRADUAÇÃO EM
BIOTECNOLOGIA- PPGBIOTEC
LABORATÓRIO DE IMUNOQUÍMICA**

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO DOS VENENOS
VARIEDADES 'AMARELA' E 'BRANCA' DA SERPENTE
AMAZÔNICA *Crotalus durissus ruruima***

ILIA GILMARA CARVALHO DOS SANTOS

**Manaus, AM
Novembro de 2017**

ILIA GILMARA CARVALHO DOS SANTOS

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO DOS VENENOS
VARIEDADES “AMARELA” E “BRANCA” DA SERPENTE
AMAZÔNICA *Crotalus durissus ruruima*.**

Orientadora: Professora Doutora Maria Cristina dos Santos

Coorientadora: Professora Doutora Consuelo Latorre Fortes Dias

Tese apresentada ao Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Amazonas, como parte dos requisitos para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia.

Área de concentração: Biotecnologia para Saúde

**Manaus, AM
Novembro de 2017**

Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S237p Santos, Ilia Gilmara Carvalho dos
Potencial antibacteriano e citotóxico dos venenos variedades
'amarela' e 'branca' da serpente amazônica *Crotalus durissus*
ruruima / Ilia Gilmara Carvalho dos Santos. 2017
84 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Maria Cristina dos Santos
Coorientadora: Consuelo Latorre Fortes Dias
Tese (Doutorado em Biotecnologia) - Universidade Federal do
Amazonas.

1. Venenos de serpentes. 2. venenos amarelos e brancos . 3.
fosfolipase A2. 4. citotoxicidade. I. Santos, Maria Cristina dos II.
Universidade Federal do Amazonas III. Título

**POTENCIAL ANTIBACTERIANO E CITOTÓXICO DOS VENENOS
VARIEDADES “AMARELA” E “BRANCA” DA SERPENTE
AMAZÔNICA *Crotalus durissus ruruima*.**

Tese apresentada aos Membros da banca Examinadora, abaixo constituída, conforme Portaria de número 07/2017, emitida pelo Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, da Universidade Federal do Amazonas - UFAM, como requisito necessário para obtenção do título de Doutora em Biotecnologia:

COMISSÃO JULGADORA:

Professora Doutora Maria Cristina dos Santos
Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Presidente da banca

Professor Doutor Andreimar Martins Soares
Fundação Oswaldo Cruz (Unidade de Rondônia - RO)
Membro da banca

Professor Doutor Oscar Tadeu Ferreira da Costa
Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Membro da banca

Professora Doutora Marne Carvalho de Vasconcellos
Universidade Federal do Amazonas - UFAM
Membro da banca

Professor Doutor Luis Andre Morais Mariuba
Fundação Oswaldo Cruz - (Unidade de Manaus – AM)
Membro da banca

Dedico:

- ❖ A minha mãe Juraci Carvalho dos Santos (*in memorian*) por me ensinar desde criança que o conhecimento é libertador.

- ❖ Ao meu querido pai Jamil Feitosa dos Santos grande incentivador da minha vida acadêmica, pelo seu amor incondicional, carinho, apoio e incentivo em todas as fases da minha vida. Por jamais medir esforços para que eu atingisse meus objetivos mesmo nas condições mais adversas. Te amo pai...

- ❖ A minha mãe de coração Adriana Almeida Lima pelas lições de força e determinação que foram muito úteis para que eu pudesse chegar até aqui.

- ❖ Aos meus irmãos de sangue e alma Roberto, Carlos e Gilberto, por serem essenciais na minha vida, pelo companheirismo e por tornar minha vida mais leve e feliz.

- ❖ Ao meu amor Marcelo de Sousa Cavalcante, por estar sempre ao meu lado e por me mostrar que o nosso amor é capaz de superar todas as dificuldades. Obrigada por me acompanhar na jornada da vida...

Agradecimentos

- ✚ À minha orientadora, Professora Doutora **Maria Cristina dos Santos**, por ter me acolhido e por todo conhecimento compartilhado, pela paciência e prazer em ensinar, e por toda ajuda concedida nos momentos em que precisei. Muito obrigada pela amizade!
- ✚ À minha coorientadora, Doutora **Consuelo Latorre Fortes Dias**. Pelas oportunidades concedidas e pela valiosa ajuda no fracionamento dos venenos. Serei eternamente grata!
- ✚ Às amigas: **Juliana Lameiras**, **Valéria Mourão** e **Maria Carolina**, pela ajuda nos experimentos e por tornarem meus dias no laboratório mais alegres. Vocês sempre terão minha eterna amizade e gratidão.
- ✚ À amiga **Patricia Danielle**, pela ajuda com os experimentos de citotoxicidade. Obrigada amiga por dispor de seu tempo e conhecimento!
- ✚ À **Leilane Bentes** pela ajuda no ensaio do cometa!
- ✚ Ao Professor Doutor **Boechat**, pelas contribuições e ensinamentos.
- ✚ A todos os integrantes do Laboratório do Serviço de Enzimologia Aplicada da FUNED, que me acolheram de forma carinhosa, especialmente a **Ana Valentim** e **Gabriel Latorre Fortes Dias** pela valiosa ajuda na realização das cromatografias.
- ✚ À Universidade Federal do Amazonas e ao Programa Multi-Institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, pela oportunidade de capacitação a mim concedida.
- ✚ À Fapeam pela concessão de bolsa de doutorado.
- ✚ Enfim, agradeço a todos que aqui não foram mencionados, mas que colaboraram direta ou indiretamente para realização deste trabalho. **OBRIGADA!**

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

Albert Einstein

RESUMO

SANTOS, Ilia Gilmaria Carvalho dos Santos. Potencial antibacteriano e citotóxico dos venenos variedades “amarela” e “branca” da serpente amazônica *Crotalus durissus ruruima*. 2017. 86p. Tese de doutorado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia para a saúde. Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Manaus, Amazonas, 2017.

Os venenos animais constituem uma das mais ricas fontes de substâncias biologicamente ativas encontradas na natureza e tal prerrogativa tem sido confirmada em estudos farmacológicos e bioquímicos, realizados com proteínas (enzimas), peptídeos, amins bioativas, dentre outros compostos, isolados de venenos de serpentes. Neste contexto, o objetivo do presente trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano e antitumoral dos venenos individuais, variedade “amarela” (Cdr68 e Cdr69) e “branca” (Cdr110 e Cdr173) da cascavel Amazônica *Crotalus durissus ruruima*. A avaliação da atividade antimicrobiana dos venenos foi realizada pela técnica de difusão do disco contra as bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *S. epidermidis*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Pseudomonas aeruginosa*). Os venenos amarelos apresentaram atividade antibacteriana contra a bactéria gram-positiva *Staphylococcus aureus*. A ação citotóxica dos venenos foi avaliada utilizando as seguintes linhagens celulares SK-Mel 103 (melanoma), MCF-7 (adecarcinoma de mama), HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCR-5 (fibroblasto humano). Os venenos Cdr68 e Cdr69 foram citotóxicos para todas as linhagens tumorais, mas foram mais potentes para a linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116) com CI_{50} de 1,8 $\mu\text{g/mL}$ e 1,3 $\mu\text{g/mL}$ para Cdr68 e Cdr69, respectivamente. Os venenos variedade branca não foram citotóxicos para as linhagens testadas. Os perfis cromatográficos de Cdr68, Cdr69, Cdr110 e Cdr173 de Exclusão Molecular apresentaram quatro picos principais. As frações isoladas foram submetidas aos testes de atividade coagulante, fosfolipásica A_2 , citotóxica e antibacteriana, todas as atividades estavam presentes no Pico II de Cdr68, e nos Picos I (citotóxica) e II do Cdr69. Os picos II de ambos os venenos foram submetidos à Cromatografia de Fase Reversa. Os picos FRP2 da Fase Reversa dos venenos apresentaram atividade fosfolipásica, citotóxica frente à linhagem HCT-116 na concentração de 100 $\mu\text{g/mL}$ e antibacteriana contra *S. aureus*. A massa deste pico foi de aproximadamente 14 kDa, compatível com PLA_2 . Interessante notar, que o veneno total apresentou maior potencial citotóxico do que as frações isoladas, mostrando um possível efeito sinérgico entre os constituintes do veneno.

Palavras-chave: Venenos de serpentes, venenos amarelos e brancos, fosfolipase A_2 , citotoxicidade.

ABSTRACT

SANTOS, Ilia Gilmará Carvalho dos Santos. Potencial antibacteriano e citotóxico dos venenos variedades “amarela” e “branca” da serpente amazônica *Crotalus durissus ruruima*. 2017. 86 p. Tese de doutorado em Biotecnologia. Área de concentração: Biotecnologia para a saúde. Universidade Federal do Amazonas - UFAM. Manaus, Amazonas, 2017.

Animal venoms are one of the richest sources of biologically active substances found in nature and such prerogative has been confirmed in pharmacological and biochemical studies of proteins (enzymes), peptides, bioactive amines, and other compounds isolated from snake venoms. In this context, the purpose of the present study was to evaluate the antibacterial and antitumor potential of the individual venoms "yellow" (Cdr68 and Cdr69) and "white" varieties of the Amazonian rattlesnake *Crotalus durissus ruruima*. The evaluation of the antimicrobial activity of the crude venoms was performed by the disc diffusion technique against gram-positive (*Staphylococcus aureus* and *S. epidermidis*) and gram-negative bacteria (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* and *Pseudomonas aeruginosa*). The yellow venoms presented antibacterial activity against gram-positive bacteria *Staphylococcus aureus*. The cytotoxic action of the venoms was evaluated using the following cell lines SK-Mel 103 (melanoma), MCF-7 (breast adenocarcinoma), HCT-116 (colorectal carcinoma) and MCR-5 (human fibroblast). Cdr68 and Cdr69 venoms were cytotoxic to all tumor lines but were more potent for the colorectal carcinoma (HCT-116) with IC₅₀ of 1.8 µg / mL and 1.3 µg / mL for Cdr68 and Cdr69 respectively. The white variety venoms were not cytotoxic to the tested strains. The chromatographic profiles of Cdr68, Cdr69, Cdr110 and Cdr173 by molecular exclusion showed four major peaks. The isolated fractions were submitted to tests of coagulant, phospholipase A₂, cytotoxic and antibacterial activity, all activities were present in Peak II of Cdr68, and in Peaks I (cytotoxic) and II of Cdr69. Peaks II of both venoms were submitted to Reverse Phase Chromatography. The FRP2 peaks of the Reverse Phase of the venoms presented phospholipase activity, cytotoxic against the strain HCT-116 in concentration of 100 µg / mL and antibacterial against *S. aureus*. The mass of this peak was approximately 14 kDa, compatible with PLA₂. It is interesting to note that the total venom presented higher cytotoxic potential than the isolated fractions, showing a possible synergistic effect among the venom constituents.

Key words: Snake venoms, yellow and white venoms, phospholipase A₂, cytotoxicity.

LISTA DE FIGURAS

Capítulo II

Figura 1: Índice de dano de células MRC-5, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69.....	32
Figura 2: Frequência e distribuição das classes de danos em células MRC-5, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69.....	32
Figura 3: Índice de dano de células HCT-116, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69.....	33
Figura 4: Frequência e distribuição das classes de danos em células HCT-116, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69.....	34
Figura 5: Imagens da morfologia das células HCT-116 após 72 horas de tratamento com Cdr68 ou Cdr69, coradas com hematoxilina e eosina.....	35
Figura 6: Percentual de Inibição do crescimento bacteriano dos Cdr68 e Cdr69 frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> 25923.....	36

Capítulo III

Figura 1: Perfis cromatográficos em exclusão molecular (Superdex 200 10X300 GL) dos venenos Cdr68 (A) e Cdr69 (B) e perfis sobrepostos dos venenos Cdr110, Cdr173 e Cdt (C).....	53
Figura 2: Curva de calibração da coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 com proteínas de massa molecular conhecida.....	53
Figura 3: Curva padrão de proteínas pré-coradas em SDS-PAGE, exemplificada para o gel de Cdr69.....	54
Figura 4: Gel de poliacrilamida com gradiente de 8-25% com strip de SDS, dos picos PI a PIV cromatografia por exclusão molecular em Superdex S200 de Cdr68 (A) e Cdr69 (B), após coloração por azul de Coomassie ou prata.....	55
Figura 5: Perfil cromatográfico (linha contínua) e perfis de atividade PLA2 (linha pontilhada) do veneno amarelo Cdr69 e branco Cdr 110 em gel filtração (Superdex 200 10X300 GL).....	56
Figura 6: Perfis de atividade coagulante dos venenos Cdr68 e Cdr69 de <i>Crotalus durissus ruruima</i> em teste realizado com plasma.....	57
Figura 7: Perfil de atividade coagulante das frações 33 e 34 de Cdr68 e Cdr69 de <i>Crotalus durissus ruruima</i> em teste realizado com fibrinogênio.....	58
Figura 8: Ensaio de citotoxicidade em células de fibroblasto humano linhagem MRC-5 e carcinoma colorretal linhagem HCT-116 realizado com frações cromatográficas da exclusão molecular do veneno Cdr68 e Cdr69.....	58
Figura 9: Perfis cromatográficos em fase reversa dos picos II (PII) obtidos por exclusão molecular dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69, brancos Cdr110 e Cdr173 e Cdt (referência).....	59
Figura 10: Alinhamento dos perfis cromatográficos em Fase Reversa de (A) Pico II completo; (B) Pico II somente das frações que apresentaram atividade fosfolipásica	60

(PIIAF); (C) Pico II somente das frações que apresentaram citotoxicidade (PIIAC) obtidos no fracionamento de Cdr68 por exclusão molecular.....	
Figura 11: Ensaio de citotoxicidade em células de fibroblasto humano linhagem MCR-5 e carcinoma colorretal linhagem HCT-116 realizado com os picos FRP2 da Fase Reversa de Cdr68 e Cdr69 (100 µg/mL).....	63
Figura 12: Citotoxicidade de frações obtidas da Fase Reversa do Pico IIAF da Exclusão Molecular.....	64
Figura 13: Inibição do crescimento bacteriano do FRP2 da Fase Reversa de Cdr68, frente à cepa <i>Staphylococcus aureus</i> 25923.....	64
Figura 14: Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de fase reversa de Cdr68, adquiridos na faixa m/z 2000-16000.....	66
Figura 15: Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de Fase Reversa de Cdr68, adquiridos na faixa m/z 14000-100000.....	67
Figura 16: Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de fase reversa de Cdr69, adquiridos na faixa m/z 2000-16000m/z.....	68
Figura 17: Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de Fase Reversa de Cdr69, adquiridos na faixa m/z 14000-100000.....	69

LISTA DE TABELAS

Capítulo II

Tabela 1: Atividade citotóxica in vitro dos venenos, variedades branca e amarela, de <i>Crotalus durissus ruruima</i> frente à linhagem de células normais de fibroblasto humano (MRC-5) e linhagens de células tumorais: Melanoma (SK-Mel-103), Adenocarcinoma de mama (MCF-7), Carcinoma colorretal (HCT-116) e células THP-1	31
--	----

Capítulo III

Tabela 1: Estimativa de massa molecular média (em kDa) das proteínas nos picos da cromatografia de exclusão molecular (Superdex 200) dos venenos de Cdr68, Cdr69 e Cdr 110.....	54
Tabela 2: Estimativa da faixa de massa molecular (kDa) das bandas proteicas em SDS-PAGE, contidas nos picos PI e PII da cromatografia de exclusão molecular dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69.....	56
Tabela 3: Dados quantitativos referentes aos picos da Fase Reversa de Cdr68.....	61
Tabela 4: Atividade fosfolipásica dos picos cromatográficos originados da Fase Reversa dos venenos Cdr68 e Cdr69.....	62
Tabela 5: Atividade coagulante de picos obtidos a partir de Fase Reversa do PicoII da Exclusão Molecular de Cdr68 e Cdr69.....	62
Tabela 6: Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr68 em faixa de aquisição de 2.000 a 16.000 m/z.....	70
Tabela 7: Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr69 em faixa de aquisição de 2.000 a 16.000 m/z.....	71
Tabela 8: Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr68 em faixa de aquisição de 14.000 a 100.000 m/z.....	72
Tabela 9: Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr69 em faixa de aquisição de 14.000 a 100.000 m/z.....	73

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS.

°C = graus Celsius

Cdr = *Crotalus durissus ruruima*

Cdt = *Crotalus durissus terrificus*

CI₅₀ = Índice de citotoxicidade que causa morte celular de 50%

DMEM = “Dulbecco’s Modified Eagle Medium” (Meio de Cultura Dulbecco Modificado)

DMSO = Dimetilsulfóxido

DNA = Ácido Desoxirribonucleico

DOX = Doxorrubicina

FUNED = Fundação Ezequiel Dias

HPLC = Cromatografia Líquida de Alta Eficiência (“High Performance Liquid Chromatography”)

mg = miligrama

mL = mililitro

MTT = Sal 3-(4,5-dimetil-2-tiazol)-2,5-difenil-2-H-brometo de tetrazolium

PLA₂ = Fosfolipase A₂

SFB = Soro Fetal Bovino

UFAM = Universidade Federal do Amazonas

µg = micrograma

µL = microlitro

SUMÁRIO

CAPÍTULO 1	17
Revisão bibliográfica.....	17
1. Objetivos.....	18
1.1. Objetivo Geral.....	18
1.2. Objetivos específicos.....	18
Capítulo II	19
Resumo.....	21
1. Introdução.....	23
2. Material e Métodos.....	25
2.1. Venenos.....	25
2.2. Avaliação do potencial citotóxico – <i>in vitro</i>	26
2.2.1. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue.....	26
2.2.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método MTT.....	26
2.3. Avaliação da genotoxicidade – Ensaio Cometa.....	27
2.4. Análise morfológica pela coloração por hematoxilina e eosina.....	28
2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana.....	29
2.5.1. Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão do disco.....	29
2.6. Análises Estatísticas.....	30
3. Resultados.....	30
3.1. Avaliação da citotoxicidade.....	30
3.2. Avaliação da genotoxicidade – Ensaio cometa.....	31
3.3. Análise morfológica pela coloração por hematoxilina e eosina.....	34
3.4. Atividade antimicrobiana.....	35
4. Discussão.....	37

Referências.....	42
Capítulo III.....	46
1. Introdução.....	47
2. Material e Métodos.....	48
2.1. Venenos.....	48
2.2. Cromatografia de Exclusão Molecular.....	49
2.3. Cromatografia de Fase Reversa.....	49
2.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	50
2.5. Atividade Fosfolipásica A ₂	50
2.6. Atividade Coagulante sobre plasma e sobre fibrinogênio.....	50
2.7. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue.....	50
2.8. Avaliação da atividade antimicrobiana – Teste microdiluição.....	51
2.9. Espectrometria de massa.....	51
2.10. Análises Estatísticas.....	52
3. Resultados.....	52
3.1. Etapa 1 – Cromatografia de Exclusão Molecular.....	52
3.1.1. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	54
3.1.2. Atividade Fosfolipásica A ₂	56
3.1.3. Atividade Coagulante sobre plasma e sobre fibrinogênio.....	57
3.1.4. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue	58
3.2. Etapa 2 – Cromatografia de Fase Reversa.....	59
3.2.1. Atividade Fosfolipásica A ₂	61
3.2.2. Atividade Coagulante sobre plasma e sobre fibrinogênio.....	62
3.2.3. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue	63
3.2.4. Atividade Antimicrobiana.....	64
3.3. Espectrometria de massa.....	65
4. Discussão.....	73

Conclusões.....	78
Referências.....	79

A presente Tese de Doutorado foi dividida em:

1. **Capítulo I - Artigo de Revisão:** Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima*.
2. **Capítulo II-** Atividade antitumoral e antibacteriana dos venenos individuais, variedades branca e amarela de *Crotalus durissus ruruima*;
3. **Capítulo III-** Citotoxicidade e atividade antibacteriana de frações isoladas dos venenos amarelos de *Crotalus durissus ruruima*.

CAPÍTULO I

REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

**Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque
para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima*¹**

¹ Artigo publicado na revista Scientia Amazonia (ISSN 2238.1910) em novembro de 2016.



Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima*¹

Ilia Gilmará Carvalho dos Santos², Consuelo Latorre Fortes-Dias³, Maria Cristina dos Santos⁴

Submetido 07/11/2016 – Aceito 09/11/2016 – Publicado on-line 09/11/2016

Resumo

As peçonhas animais são secreções ricas em toxinas, sintetizadas e armazenadas em glândulas, altamente especializadas, e injetadas em suas vítimas por presas, ou dentes, ou acúleos para que possam exercer suas atividades biológicas. Alguns pesquisadores definem a peçonha como uma saliva modificada, contendo uma mistura de diferentes compostos usados, pelo animal, para sua defesa contra predadores ou para imobilizar presas, que servirão de alimentação. As peçonhas animais constituem uma das mais ricas fontes de substâncias biologicamente ativas encontradas na natureza. Estudos farmacológicos e bioquímicos, realizados nas últimas décadas, têm mostrado a diversidade de proteínas com atividade enzimática, toxinas, peptídeos, amins bioativas, dentre outros compostos, nos venenos de serpentes. Nesse contexto, os venenos de serpentes brasileiras têm sido alvo de uma série de estudos, os quais resultaram, por exemplo, no desenvolvimento de medicamentos como o Captopril®—derivado de um peptídeo isolado do veneno de *Bothrops jararaca*—e o Batroxobin®—uma enzima isolada do veneno de *Bothrops atrox*. Portanto, os constituintes dos venenos podem ser ferramentas importantes no desenvolvimento de protótipos de novas drogas.

Palavras-Chave: cascavel amazônica, antitumoral, antimicrobiana, veneno, *Crotalus durissus terrificus*

Abstract

Pharmacological applications of Brazilian snake venoms with emphasis in *Crotalus durissus terrificus* and *Crotalus durissus ruruima*. Animal venoms are toxin-rich secretions, which are synthesized and stored in highly specialized glands and injected into their victims by fangs, teeth or spines, so that they can exert their biological activities. Some authors believe that some venoms are a modified saliva composed of a mixture of different compounds aiming at defending against predators or immobilizing preys for feeding. Animal venoms are among the richest natural sources of biologically active substances. Concerning snake venoms, in recent decades pharmacological and biochemical studies revealed a diversity of enzymes, toxins, peptides, bioactive amines, and other bioactive molecules in their composition. The results led to the development of important drugs, such as Captopril® — derived from a peptide isolated from *Bothrops jararaca* venom —, and Batroxobin®—an enzyme present in *Bothrops atrox* venom. Therefore, venom components can be important tools in the development of new drug prototypes.

Key-words: Amazonian rattlesnake, antitumor, antimicrobial, venom, *Crotalus durissus terrificus*

¹ Revisão referente a parte da Tese de Doutorado do primeiro autor

² Doutoranda no Programa de Pós-graduação em Biotecnologia na Universidade Federal do Amazonas. e-mail: iliagilmará@hotmail.com

³ Serviço de Enzimologia, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, Minas Gerais

⁴ Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Rodrigo Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, CEP: 69077-000, Manaus, Amazonas, Brasil

1. Introdução

As peçonhas (ou venenos) de serpentes consistem em uma mistura complexa de proteínas, com ou sem atividade catalítica, como fosfolipases A₂ (PLA₂), serinoproteases, hialuronidasas, L-aminoácido oxidases (LAO), acetilcolinesterases, fatores de crescimento, ativadores de proteína C, dentre outros. Compostos orgânicos de baixo peso molecular também fazem parte da composição das peçonhas como hidratos de carbono, serotonina, histamina, citrato, nucleosídeos, e íons inorgânicos, tais como cálcio, cobalto, magnésio, cobre, ferro e potássio, assim como inibidores enzimáticos (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006). A composição química quantitativa e qualitativa dos venenos pode apresentar variações interfamílias, intergêneros, interespecies e intraespecies. As variações intraespecies podem ocorrer devido à localização geográfica, sazonalidade, dieta, idade e sexo, além de outras (CHIPPAUX et al., 1991).

Embora grande número de compostos tenha sido isolado de diferentes venenos, as proteínas e peptídeos de baixa massa molecular representam aproximadamente 90% de seu peso seco e são responsáveis pela maioria dos efeitos biológicos observados (BIEBER, 1979).

Recentemente, a procura por substâncias farmacologicamente ativas tem aumentado consideravelmente, sendo que a busca, por compostos bioativos naturais, desperta grande interesse. O estudo dos compostos presentes em venenos tem se mostrado uma importante ferramenta nesta busca, pois podem servir de base para o desenho de protótipos e consequente desenvolvimento de novos agentes terapêuticos (KUMAR et al., 2013).

Atualmente já são utilizados, na clínica médica, fármacos derivados de venenos de serpentes, como, o Captopril[®], derivado de um peptídeo isolado do veneno de *Bothrops jararaca*, descoberto em 1975, graças à observação do efeito desse veneno sobre a pressão arterial de pacientes acidentados por essa espécie de serpente. O Captopril[®] foi o primeiro fármaco derivado de veneno de serpente a chegar ao mercado farmacêutico e trata-se de um potente inibidor da enzima conversora de angiotensina (ECA) utilizado como anti-hipertensivo (KOH et al., 2006). Outro fármaco derivado de veneno de serpente é a hemocoagulase comercializada como Batroxobin[®], uma enzima *trombin-like* utilizada para prevenir e tratar hemorragias, que foi isolada

do veneno de *Bothrops atrox*, uma das espécies de jararaca encontrada na região Norte do Brasil. A tirofibana, comercializada como Agrastat[®], é derivada do veneno de uma serpente asiática, a *Echis carinatus*, e é indicada para prevenir a formação de coágulos de sangue, que podem causar ataque cardíaco e outros sérios problemas do fluxo sanguíneo (KOH et al., 2006).

Os venenos de serpentes brasileiras são alvo de uma série de estudos. No que se refere ao gênero *Crotalus*, grande parte das pesquisas foram realizadas com a espécie *Crotalus durissus terrificus*, que segundo a ferramenta *Derwent* da plataforma de busca *Web of Science*, resultaram em vinte patentes, sendo que apenas duas estão depositadas no Brasil. Este fato demonstra que são necessárias mais pesquisas a cerca das atividades farmacológicas de venenos e suas possíveis aplicações terapêuticas, visto que o Brasil possui um grande número de gêneros e espécies de serpentes peçonhentas.

2. Metodologia

Para a elaboração do presente artigo foram consultados os seguintes sítios de busca de bancos de dados: *Pubmed*, *Scopus*, *SciELO*, *ScienceDirect* e *Web of Science* no período de 1938 a 2016. As palavras chaves utilizadas foram: “snake venom” associada com as palavras “isolation”, “biological activities”, “antimicrobial”, “antitumoral” e *Crotalus durissus*.

3. Serpentes Brasileiras enfoque para *Crotalus* sp.

As serpentes da fauna brasileira de importância médica pertencem às famílias Colubridae (*Philodryas olfersii*, *Philodryas patagoniensis*) (ARAÚJO; DOS-SANTOS, 1997) (*Clelia* sp.) (ALBUQUERQUE et al., 2013) Elapidae (*Micrurus* sp.) e Viperidae (*Bothrops* sp., *Bothriopsis* sp., *Porthidium* sp., *Crotalus* sp. e *Lachesis* sp.).

As serpentes do gênero *Crotalus* sp. são encontradas somente no Novo Mundo (do sul do Canadá à Argentina Central). No Brasil, o gênero *Crotalus* é amplamente distribuído, apesar de possuir apenas uma espécie *C. durissus* e cinco subespécies: *C. d. terrificus* (regiões Sul e Sudeste), *C. d. collilineatus* (Minas Gerais e Goiás), *C. d. cascavella* (região de caatinga nordestina), *C. d. ruruima* (Roraima) e *C. d. marajoensis* (ilha do Marajó – Pará) (JORGE;

RIBEIRO, 1992; PINHO; PEREIRA, 2001). Popularmente são conhecidas como cascavel, cascavel-quatro-ventas, boicininga, maracambóia, maracá, dentre outras denominações. Habitam campos abertos, áreas secas, arenosas, pedregosas e, raramente, a faixa litorânea. Porém, não são encontradas em florestas ou no Pantanal. Não tem por hábito atacar suas vítimas e, quando excitadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho, presente em sua cauda (BRASIL, 2001). As cascavéis são responsáveis por 7,7% dos acidentes ofídicos registrados no Brasil, podendo representar até 30% dos acidentes em algumas regiões, como no Estado de Roraima (BRASIL, 2001). O acidente crotálico apresenta alto coeficiente de letalidade, pois, frequentemente, evolui para insuficiência renal aguda (AMARAL et al., 1986).

Os venenos das subespécies de *Crotalus durissus* são compostos por uma mistura de moléculas de natureza proteica com ou sem atividade catalítica, como fosfolipases A₂, serinoproteases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases, peptídeos, compostos orgânicos de baixo peso molecular como carboidratos, serotonina; íons inorgânicos como o cálcio, magnésio, cobre, ferro, bem como inibidores enzimáticos (RAMOS; SELISTRE-DE-ARAÚJO, 2006). Diversos trabalhos foram realizados com os venenos brutos ou com frações isoladas dos venenos das subespécies de *C. durissus* e esses demonstraram uma variedade de ações farmacológicas, dentre as quais se destacam as atividades antifúngica, antileishmania, antiplasmódica, antiviral, antibacteriana e antitumoral (DIZ FILHO et al., 2009; SOARES et al., 2010; BARROS et al., 2011; MULLER et al., 2012; QUINTANA et al., 2012; VARGAS et al., 2013; BARROS et al., 2015; NEVES et al., 2015). Embora os venenos das subespécies apresentem um perfil eletroforético semelhante, existem diferenças em suas atividades biológicas, que podem ser atribuídas à existência de isoformas de proteínas, presentes nesses venenos (RANGEL-SANTOS et al., 2004).

3.1 O veneno de *Crotalus durissus terrificus*.

Dentre os venenos de cascavéis brasileiras, o mais estudado quanto à sua composição química e atividades biológicas, é o de *Crotalus durissus terrificus*; logo, a maior parte dos dados acerca das manifestações locais e

sistêmicas do acidente crotálico diz respeito a ações induzidas pelo veneno dessa subespécie (DOS-SANTOS, 2014). O veneno de *C. d. terrificus* causa poucas manifestações no local da picada. Segundo Jorge e Ribeiro (1992), as manifestações mais frequentes na região da picada são dor, edema, eritema e parestesia. Em relação a manifestações sistêmicas, esse veneno induz três ações principais: neurotóxica, miotóxica e coagulante (JORGE; RIBEIRO, 1992). O acometimento renal causado pela miotoxicidade sistêmica é frequente (AZEVEDO MARQUES et al., 1985) e associado a sinais decorrentes da ação neurotóxica do veneno como alterações do estado de consciência, ptose palpebral bilateral, fraqueza muscular generalizada e diplopia (AMARAL et al., 1986).

As proteínas e peptídeos de pequeno peso molecular representam aproximadamente 90% do veneno total seco (BIEBER, 1979). A peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, quando fracionada, apresenta quatro principais toxinas: a crotoxina, convulxina, giroxina (trombina-similes) e, em alguns venenos, a crotamina (MARTINS et al., 2002; TOYAMA et al., 2003).

A crotoxina foi isolada pela primeira vez, em 1938, por Slotta e Fraenkel-Conrat, do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e apresentou peso molecular de aproximadamente 30.000 daltons e ponto isoelétrico de 4.7 (SLOTTA; FRAENKEL-CONRAT, 1938; HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971).

A crotoxina é o componente mais tóxico na peçonha de *Crotalus durissus terrificus* e está presente em grande proporção (cerca de 40 a 60% de seu peso seco). Essa neurotoxina é formada por duas subunidades, uma básica, a fosfolipase A₂ (Componente B ou Crotoxina B) e a outra ácida, a crotapotina (Componente A ou Crotoxina A). Quando as subunidades são injetadas isoladamente apresentam baixa toxicidade, como é o caso da fosfolipase A₂, ou não apresentam ação tóxica, como a crotapotina. No entanto, quando é restaurada a interação iônica entre essas duas subunidades, formando a crotoxina, este complexo apresenta alta toxicidade (BANCHER et al., 1973). A crotapotina atua como chaperonina para a fosfolipase A₂, direcionando esta enzima para o alvo e, com isso, evita a sua ligação inespecífica, potencializando a ação tóxica (BOUCHIER et al., 1991).

Desde que a crotoxina foi isolada, vários estudos investigaram suas atividades biológicas,

que incluem, principalmente, neurotoxicidade, mas também miotoxicidade, nefrotoxicidade e a cardiotoxicidade. No entanto, nos últimos anos, uma variedade de outras importantes ações como imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e analgésica, foram descritas para este complexo proteico (YAN et al., 2006; ZHANG et al., 2006; ZAMBELLI et al., 2008; DIZ FILHO et al., 2009; NUNES et al., 2010).

A crotamina, presente apenas em alguns venenos de *Crotalus durissus terrificus*, foi isolada em 1950, pela primeira vez, por Moura-Gonçalves e trata-se de um polipeptídeo composto por 42 aminoácidos, com massa molecular de aproximadamente 4.900 Daltons (LAURE, 1975). Sua estrutura tridimensional, determinada por espectroscopia de ressonância magnética nuclear aplicada à proteína em solução, demonstrou que, pelo enovelamento apresentado, a crotamina pertence à família estrutural das defensinas β , que são peptídeos antimicrobianos encontrados em animais vertebrados (FADEL et al., 2005). A injeção intramuscular de crotamina de *Crotalus durissus terrificus* em camundongos induz hiperextensão imediata na pata afetada com posterior paralisia, ptose palpebral, hipersecreção lacrimal, dispneia, taquicardia e ausência de resposta a estímulos mecânicos, vinte minutos após a injeção. A paralisia total dos membros, taquicardia, dispneia, e ptose pronunciada podem permanecer até 24 horas após a injeção. O estudo histológico do músculo gastrocnêmico revelou vacuolização intensa do citoplasma (DOS-SANTOS et al., 1993a). A crotamina induz ação miotóxica sobre células musculares esqueléticas, causando danos ou até morte celular; acredita-se que este efeito se deve às alterações cinéticas dos canais de Na^+ (MATAVEL et al., 1998). Além da atividade miotóxica, já foram descritas atividades antibacteriana, antifúngica, antiparasitária e antitumoral para a crotamina (HAYASHI et al., 2008; OGUIURA et al., 2011; PEREIRA et al., 2011; YAMANE et al., 2013; MALUF et al., 2016).

A giroxina pertence ao grupo das enzimas trombina-símile, importantes serinoproteases, e foi isolada pela primeira vez do veneno de *Crotalus durissus terrificus* por Barrio, em 1961. Essa neurotoxina não é letal, mas causa uma síndrome, em animais, caracterizada por movimentos rotacionais em volta do eixo central do corpo. Daí a origem do seu nome (BARRIO, 1961). A giroxina é na realidade a enzima

trombina-símile, responsável pela ação coagulante do veneno, transformando diretamente fibrinogênio em fibrina (ALEXANDER et al., 1988). A ação girotóxica é devida a formação de neuropeptídeos, durante a clivagem do fibrinogênio endógeno pela trombina-símile ou giroxina (ALEXANDER et al., 1988).

A convulxina, encontrada no veneno de algumas subespécies de *Crotalus durissus*, recebeu essa denominação, pois acreditava-se ser a responsável pelas convulsões e distúrbios observados em vítimas de acidentes com essas serpentes. Porém, a convulxina não induz atividade convulsiva, sendo sim uma potente ativadora de plaquetas (MELLO; CAVALHEIRO, 1989).

3.2 O veneno de *Crotalus durissus ruruima*.

Apesar de *Crotalus durissus ruruima* ser responsável por um grande número de acidentes em Roraima e alguns espécimes dessa subespécie apresentarem atividade hemorrágica, os sinais e sintomas induzidos por seu veneno são pouco conhecidos. As atividades biológicas e os componentes bioquímicos de misturas de venenos das variedades “branca” e “amarela” da subespécie *C. d. ruruima* foram caracterizados, pela primeira vez por Dos-Santos e colaboradores, em 1993b, e foram observadas para a variedade branca as seguintes atividades: letal, coagulante, miotóxica, edematogênica e miolítica. A variedade amarela, além das atividades apresentadas pela “branca”, induziu hemorragia local, necrose e atividade caseinolítica. Embora, outros venenos de *Crotalus* sp. de exemplares oriundos das Américas Central e do Norte apresentem também hemorraginas, vale ressaltar que para os venenos de outras subespécies de *C. durissus*, encontradas no Brasil, até o momento, não foi relatada atividade hemorrágica, sendo, portanto esta atividade exclusiva da subespécie *C. d. ruruima* (DOS-SANTOS et al., 1993b).

Dos-Santos e colaboradores (2005) analisaram, isoladamente, os venenos de seis exemplares de *Crotalus durissus ruruima* (coletados em uma mesma localidade), quanto às suas atividades biológicas e constituintes proteicos, e observaram que as serpentes com venenos da variedade branca apresentaram maior concentração de crotamina do que as da variedade amarela, além de variações no perfil proteico, nas atividades biológicas e nas intensidades de suas ações induzidas. Tais resultados corroboram com

a existência de uma variabilidade intrapopulacional nas composições dos venenos de *C. d. ruruima*, e a importância de usar misturas de venenos para a produção de antivenenos, a fim de assegurar a neutralização do maior número possível de toxinas produzidas por serpentes de dada espécie (DOS-SANTOS et al., 2005). Em 2010, Calvete e colaboradores, demonstraram que 82,7% do veneno de um desses exemplares da variedade branca de *C. d. ruruima* era composto por crotoxina e, dentre os venenos estudados, foi o que apresentou maior concentração desta toxina. No mesmo estudo, a concentração de crotoxina determinada no veneno de *C. d. terrificus* foi de 59,5%.

O fracionamento do veneno branco de *Crotalus durissus ruruima*, por cromatografia de fase reversa, resultou em dezoito frações e duas destas, a Cdr-12 e a Cdr-13, apresentaram atividade PLA₂. O sequenciamento e posterior alinhamento dos aminoácidos destas frações mostrou um alto grau de similaridade, tratando-se, portanto, de duas isoformas de PLA₂. No entanto, a análise comparativa da atividade enzimática dessas duas isoformas mostrou diferenças entre as atividades fosfolipásicas (PONCE-SOTO et al., 2007). As enzimas nativas, Cdr-12 e Cdr-13, foram submetidas ainda a um processo de modificação química e em seguida, suas características físico-químicas e biológicas foram avaliadas e apresentaram baixa atividade catalítica, revelando a importância de se conhecer a relação estrutura-função (VARGAS, 2007). Em 2009, Diz Filho também isolou duas isoformas de PLA₂ distintas e denominou-as de PLA₂A e PLA₂B. Após as caracterizações das estruturas primárias de PLA₂A e PLA₂B, foram constatadas semelhanças com as isoformas Cdr-12 e Cdr-13, confirmando a presença de duas isoformas de PLA₂ distintas, com características farmacológicas particulares. Fonseca e colaboradores, em 2010, modificaram as estruturas de fosfolipases A₂, isoladas do veneno de *C. d. ruruima* com etil 2-oxo-2H- chromen-3-carboxilato (EOCC), uma cumarina sintética. As PLA₂ foram inibidas irreversivelmente e apresentaram redução nas atividades de agregação plaquetária e de edema de pata, demonstrando o potencial antitrombótico e anti-inflamatório do EOCC frente à ação fosfolipásica A₂.

Veneno total de *Crotalus durissus ruruima* foi também comparado ao de *C. d. cumanensis*, uma subespécie encontrada na

Venezuela e Colômbia. Efeitos neuromusculares dos venenos brutos e das crotoxinas isoladas, revelaram que ambos possuem atividade neurotóxica como consequência da presença de crotoxina. A crotoxina de *C. d. cumanensis* foi mais potente do que a de *C. d. ruruima*, pois, nas mesmas concentrações induziu atividades neurotóxica e miotóxica direta comparativamente mais altas (CAVALCANTE et al., 2015). A análise das sequências de aminoácidos amino-terminais das PLA₂s de *C. d. ruruima* foram semelhantes às de *C. d. terrificus* enquanto as PLA₂ de *C. d. cumanensis* apresentaram maior homologia com as PLA₂ de *C. d. cascavella* e de *C. d. collilineatus* (FONSECA, 2011).

Uma isoforma de crotamina denominada ILe19, foi isolada de um exemplar de *Crotalus durissus ruruima* que secretava veneno amarelo, coletado em Pacaraima (RR). A única diferença desta crotamina para a de *C. d. terrificus* é que a crotamina ILe19, apresenta uma isoleucina ao invés de leucina na posição 19 e essa troca de aminoácido impede a ação miotóxica da crotamina ILe19 (DOS-SANTOS et al., 1993a; ALCÂNTARA et al., 2011). Outros venenos de *C. d. ruruima* das variedades branca ou amarela, coletados em Boa Vista (RR), não apresentaram crotamina em suas composições, corroborando com a existência de variabilidade interpopulacional (DOS-SANTOS et al., 2005; CALVETE et al., 2010). Quando a crotamina de *C. d. ruruima* foi injetada em camundongos, foi observada a hiperextensão da pata com subsequente paralisia dos membros posteriores, ptose e taquicardia, de forma semelhante ao que ocorre com a crotamina de *C. d. terrificus*. No entanto, todos os sinais e sintomas desapareceram 30 minutos após a injeção e não foram observadas lesões celulares (DOS-SANTOS et al., 1993a). Alcântara e colaboradores (2011) relataram mudanças conformacionais induzidas pela troca do aminoácido da posição 19, entre as moléculas de crotaminas de *C. d. terrificus* e de *C. d. ruruima*, o que poderia explicar as diferenças nas atividades biológicas observadas por Dos-Santos et al., 1993b.

3.3. Atividades antimicrobiana, antiviral, antiparasitária e antifúngica de venenos ofídicos.

As infecções bacterianas estão entre as dez principais causas de morte em todo o mundo. O surgimento de resistência bacteriana, decorrente

do uso indiscriminado de antimicrobianos, tem sido o principal fator responsável pelo aumento da morbidade e mortalidade causadas por essas infecções (SANTOS, 2004). Assim, a busca de substâncias de origem animal e vegetal para o desenvolvimento de drogas mais eficazes constitui uma estratégia promissora no campo da Biotecnologia, uma vez que possibilita a iniciativa de prospecção de novas classes de moléculas naturais ou sintéticas (HEINEMANN et al., 2000).

Os primeiros relatos sobre a atividade antibacteriana em venenos de serpente foram feitos em 1948 e em 1968, envolvendo serpentes das famílias Elapidae e Viperidae (GLASER, 1948; ALOOF-HIRSCH et al., 1968). Os venenos de *Naja* spp. e *Hemachatus haemachatus* foram capazes de romper as membranas fosfolipídicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (ALOOF-HIRSCH et al., 1968). Queiroz (2010) verificou que diferentes diluições do veneno bruto da serpente *Bothrops moojeni* inibiram o crescimento de bactérias gram-negativas produtoras e não produtoras de metalo- β -lactamases e β -lactamases, e que o tamanho do halo de inibição do crescimento bacteriano diminuiu na medida em que diminui a concentração do veneno bruto e conseqüentemente a quantidade de proteínas, demonstrando que o efeito foi dose dependente. Já Ferreira (2007) demonstrou que o veneno de *B. atrox* possui atividade contra *Staphylococcus epidermidis* e *Enterococcus faecalis*, enquanto o veneno de *B. jararaca* foi ativo contra a cepa de *S. aureus*. Neste estudo, todos os venenos testados foram tão promissores quanto os controles positivos utilizados (vancomicina, oxacilina e o cloranfenicol), o que sugere serem fontes potenciais para desenvolvimento de novos antimicrobianos.

Em estudos com subespécies de *Crotalus durissus*, a fosfolipase A₂ do veneno branco de *C. d. ruruima* exibiu atividade antibacteriana notável frente a *Xanthomonas axonopodis pv passiflorae*, uma vez que 75 μ g de proteína foram capazes de inibir 96% da taxa de crescimento bacteriano (DIZ FILHO et al., 2009). O veneno bruto apresentou discreta inibição de crescimento de *Candida albicans* (NEVES et al., 2015). No veneno *C. d. cascavella*, a enzima L-amino ácido oxidase (LAO) inibiu o crescimento da bactéria gram-negativa *X.s axonopodis pv passiflorae* e da gram-positiva *Streptococcus mutans*, sugerindo

que o peróxido de hidrogênio produzido por LAO induz ruptura da membrana e, conseqüentemente, perda de conteúdo citoplasmático. Essa LAO também apresentou alta atividade leishmanicida *in vitro* contra formas promastigotas de *Leishmania amazonensis* (TOYAMA et al., 2006). A PLA₂ de *C. d. cumanensis* demonstrou ação antimalárica, exercendo atividade antiplasmódica frente ao *Plasmodium falciparum*, em doses que não são letais para os camundongos e que não são citotóxicas para células mononucleares do sangue humano (QUINTANA et al., 2012).

Em relação à atividade antiviral, veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* conferiu resistência às infecções de células Vero E6 pelos vírus de dengue ou de febre amarela, porém as células que foram tratadas com crotocina apresentaram maior proteção contra as infecções virais. Por outro lado, em células já infectadas com vírus dengue ou da febre amarela, que foram tratadas, posteriormente, com o veneno bruto ou toxinas, a replicação viral não foi inibida (MULLER et al., 2012).

Nos últimos anos, a crotamina se tornou alvo de estudos de atividade antimicrobiana, devido a sua semelhança estrutural com β -defensinas. Oguiura e colaboradores (2011) verificaram que crotamina de *Crotalus durissus terrificus* exibiu atividade antibacteriana contra cepas de *E. coli*, com valores de concentrações inibitórias mínimas variando de 25 a 100 μ g/ml; no entanto, não foi observada atividade frente a *Pseudomonas aeruginosa*, *Salmonella typhimurium*, *S. aureus* e *Listeria monocytogenes*. Segundo os autores, a toxina mata as bactérias pela permeabilização da membrana. Posteriormente, Yamane et al. (2013) demonstraram que a crotamina não tem atividade contra fungos filamentosos como *Aspergillus fumigatus* e *Trichophyton rubrum*, mas tem atividade antifúngica frente a levedura *Candida* spp. A crotamina de *C. d. terrificus* demonstrou atividade antiparasitária dose-dependente contra *Plasmodium falciparum* e foi sugerido que o efeito citotóxico observado pode envolver o rompimento de vesículas ácidas comprometendo a homeostase do parasita (MALUF et al., 2016).

3.4. Atividade citotóxica de venenos ofídicos.

O câncer é uma das principais causas de morte em todo o mundo. As modalidades de tratamento incluem a radiação, cirurgia,

quimioterapia, imunoterapia e terapia hormonal. Atualmente, o uso de quimioterápicos é a opção predominante para a terapia do câncer. No entanto, um dos principais problemas é que os pacientes muitas vezes não respondem ou, eventualmente, desenvolvem resistência após o tratamento inicial (KUMAR et al., 2013). Essa limitação levou ao aumento da busca por substâncias que auxiliem no tratamento e cura do câncer a partir de fontes naturais, como plantas e animais. A biodiversidade de venenos os torna fonte única, a partir da qual podem ser desenvolvidas novas terapias. De 1940 a 2007, das 155 novas moléculas citotóxicas desenvolvidas, 47% são produtos naturais ou derivados diretamente dessas fontes (NEWMAN; CRAGG, 2007). Estudos realizados durante as três últimas décadas, em busca de propriedades anticâncer, em venenos, levaram à descoberta de moléculas promissoras com essa atividade, algumas das quais estão em ensaios clínicos e poderão se tornar drogas terapêuticas, futuramente (GOMES et al., 2010).

Venenos brutos de serpentes das famílias Elapidae, Crotalidae e Viperidae causaram lise em células de sarcoma de Yoshida (BRAGANÇA et al., 1967). Mais especificamente, o veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* atua diretamente sobre as células tumorais e essa atividade pode ser devida a resposta inflamatória mediada pelas citocinas e quimiocinas (DA SILVA et al., 1996). Em linhagem de células tumorais de carcinoma ovariano de hamster CHO-K1, foram observadas alterações estruturais significativas em filamentos de actina, retículo endoplasmático e núcleo, além de fragmentação do DNA sugerindo que o veneno *C. d. terrificus* induziu apoptose nessa linhagem celular (TAMIETI et al., 2007). Efeito antitumoral foi também descrito para o mesmo veneno em células das glioblastoma (RT2) e adenoma benigno de pituitária (GH3), o que pode ser atribuído, pelo menos parcialmente, à crotoxina, indicando um potencial biotecnológico deste veneno na terapia do câncer (SOARES et al., 2010). A crotoxina de *C. d. terrificus* foi citotóxica para linhagens celulares Hs578T (carcinoma de ducto mamário humano) e SK-LU-1 (adenocarcinoma pulmonar - RUDD et al., 1994), células escamosas de carcinoma pulmonar humano SK-MES-1 (por apoptose e autofagia) (HAN et al., 2014), como também para eritroleucemia de murinos *in vitro* (mediada pela fosfolipase A₂ - CORIN et al., 1993).

Em ensaio clínico de fase I, realizado em 2002, a PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus* administrada em pacientes com câncer promoveu a inibição no crescimento tumoral, sendo 83% para carcinoma pulmonar, 69% para carcinoma mamário humano e 44% para leucemia. Os efeitos colaterais relatados foram diplopia, ptose palpebral, nistagmo, ansiedade, sialorréia, aumentos transitórios nos níveis de creatinina quinase, aspartato aminotransferase e alanina transaminase, efeitos esses atribuídos à miotoxicidade da crotoxina e à reação anafilática (CURA et al., 2002).

Hayashi e colaboradores (2008) observaram, que diferentemente de outras drogas anticâncer, a crotamina de *Crotalus durissus terrificus* tem como alvo primário, a mitocôndria e os lisossomos, levando a um aumento das concentrações de cálcio livre nas células cancerosas. Na concentração de cinco micrograma/ mL, a crotamina foi letal para as linhagens B16-F10 (melanoma de murino), SK-Mel-28 (melanoma humano) e Mia PaCa-2 (carcinoma pancreático humano) e inofensiva para células não tumorais. Tratamento com crotamina por 21 dias, em modelo de melanoma murino *in vivo*, retardou significativamente a implantação do tumor, inibiu o crescimento tumoral e aumentou a sobrevivência dos animais (PEREIRA et al., 2011).

4. Conclusão

Os compostos presentes no veneno da serpente amazônica *Crotalus durissus ruruima* se assemelham aos encontrados no veneno de *C. d. terrificus*, porém, com variações quantitativas e qualitativas que se refletem em suas atividades biológicas. Atividades antimicrobianas e antitumorais já foram descritas para os componentes do veneno de *C. d. terrificus*, principalmente em relação à crotoxina e crotamina, toxinas presentes também no veneno de *C. d. ruruima*. Diante do exposto, o veneno bruto e as frações isoladas do veneno de *C. d. ruruima* e das demais espécies peçonhentas amazônicas apresentam um elevado potencial biotecnológico, sendo relevante o estudo de suas ações e de seus potenciais farmacológicos.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Produtividade a Maria Cristina dos Santos. À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do



Amazonas pela concessão da Bolsa de Doutorado a Ilia Gilmara Carvalho dos Santos. À FAPEMIG pela concessão de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico a Consuelo Latorre Fortes-Dias.

Divulgação

Este artigo é inédito e não está sendo considerado para qualquer outra publicação. O(s) autor(es) e revisores não relataram qualquer conflito de interesse durante a sua avaliação. Logo, a revista *Scientia Amazonia* detém os direitos autorais, tem a aprovação e a permissão dos autores para divulgação, deste artigo, por meio eletrônico.

Referências

ALBUQUERQUE, P. L. M. M.; SILVA JUNIOR, G. B.; JACINTO, C. N.; LIMA, C. B.; LIMA, J. B.; VERAS, M. D. S. B.; DAHER, E. F. Epidemiological profile of snakebite accidents in a metropolitan area of northeast Brazil. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 55, p. 347-351, 2013.

ALCÂNTARA, A. F. C.; VELOSO, D. P.; FERNANDES, A. J.; DOS-SANTOS, M. C. Theoretical Investigation of the Structural Properties of Two Crotoamines. **The Open Natural Products Journal**, v. 4, p. 16-20, 2011.

ALEXANDER, G.; GROTHUSEN, J.; ZEPEDA, H.; SCHWARTZMAN, R. J. Gyroxin, a toxin from the venom of *Crotalus durissus terrificus*, is a thrombin-like enzyme. **Toxicon**, v. 26, n. 10, p. 953-960, 1988.

ALOOF-HIRSCH, S.; DE VRIES, A.; BERGER, A. The direct lytic factor of cobra venom: purification and chemical characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure**, v. 154, n. 1, p. 53-60, 1968.

AMARAL, C. F. S.; REZENDE, N. A.; SILVA, O. A.; RIBEIRO, M. M. F.; MAGALHÃES, R. A.; REIS, R. J.; CARNEIRO, J. G.; CASTRO, J. R. S. Insuficiência Renal Aguda Secundária a Acidentes Ofídicos Botrópico e Crotálico. Análise de 63 Casos. **Rev. Inst. Med trop. São Paulo**, v. 28, n. 4, p. 220-227, 1986.

ARAÚJO, M. E.; DOS-SANTOS, A. C. M. C. A. Cases of human envenoming caused by *Philodryas olfersii* and *Philodryas patagoniensis* (serpentes:

Colubridae). **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 30, p. 517-519, 1997.

AZEVEDO MARQUES, M. M.; CUPO, P.; COIMBRA, T.M.; HERING, S. E.; ROSSI, M. A.; LAURE, C. J. Myonecrosis, myoglobinuria and acute renal failure induced by South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*) envenomation in Brazil. **Toxicon**, v. 23, p. 613-636, 1985.

BANCHER, W.; ROSA, R. R.; FURLANETO, R. S. Estudos sobre a fixação eletiva e quantitativa do veneno *Crotalus durissus terrificus* nos tecidos nervosos, renal, hepático e muscular de *Mus musculus* Linnaeus, 1758. **Memórias do Instituto Butantan**, v. 37, p. 139-148, 1973.

BARRIO, A. Gyroxin, a new neurotoxin of *Crotalus durissus terrificus* venom. **Acta Physiol Latinoamer**, v. 11, p. 224-232, 1961.

BARROS, G. A. C.; PEREIRA, A. V.; BARROS, L. C.; JR, A. L.; CALVI, S. A.; SANTOS, L. D.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA, R. S. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 1-9, 2015.

BARROS, L.; SOARES, A.; COSTA, F.; RODRIGUES, V.; FULY, A.; GIGLIO, J.; GALLACCI, M.; THOMAZINI-SANTOS, I.; BARRAVIERA, S.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JUNIOR, R. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 23-33, 2011.

BIEBER, A. L. Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. In: LEE, C.-Y. (Eds.). **Snake Venoms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1979. p. 295-306.

BOUCHIER, C.; BOULAIN, J.-C.; BON, C.; MÉNEZ, A. Analysis of cDNAs encoding the two subunits of crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from rattlesnake venom: the acidic non enzymatic subunit derives from a phospholipase A2-like precursor. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Gene Structure and Expression**, v. 1088, n. 3, p. 401-408, 1991.



BRAGANÇA, B. M.; PATEL, N. T.; BADRINATH, P. G. Isolation and properties of a cobra venom factor selectively cytotoxic to yoshida sarcoma cells. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects**, v. 136, n. 3, p. 508-520, 1967.

BRASIL. Ministério da Saúde. Fundação Nacional de Saúde (FUNASA). **Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes por animais peçonhentos**. 2. ed. Brasília, 2001.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CID, P.; DE LA TORRE, P.; FLORES-DÍAZ, M.; DOS SANTOS, M. C.; BORGES, A.; BREMO, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 1, p. 528-544, 2010.

CAVALCANTE, W. L. G.; PONCE-SOTO, L. A.; MARANGONI, S.; GALLACCI, M. Neuromuscular effects of venoms and crotoxin-like proteins from *Crotalus durissus ruruima* and *Crotalus durissus cumanensis*. **Toxicon**, v. 96, p. 46-49, 2015.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CORIN, R. E.; VISKATIS, L. J.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. A. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. **Investigational New Drugs**, v. 11, n. 1, p. 11-15, 1993.

CURA, J. E.; BLANZACO, D. P.; BRISSON, C.; CURA, M. A.; CABROL, R.; LARRATEGUY, L.; MENDEZ, C.; SECHI, J. C.; SILVEIRA, J. S.; THEILLER, E.; ROODT, A. R.; C.2, V. J. Phase I and Pharmacokinetics Study of Crotoxin (Cytotoxic PLA2, NSC-624244) in Patients with Advanced Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 8, p. 1033 a 1041, 2002.

DA SILVA, R. J.; FECCHIO, D.; BARRAVIERA, B. Antitumor effect of snake venoms. **Journal of Venomous Animals and Toxins**, v. 2, p. 79-90, 1996.

DIZ FILHO, E. B. S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D. O.; FAGUNDES, F. H. R.; OLIVEIRA, S. C. B.; FONSECA, F. V.; CALGAROTTO, A. K.; JOAZEIRO, P. P.; TOYAMA, M. H. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 104-114, 2009.

DOS-SANTOS, M. C. Crotoxina e Crotoxina-Simile Isoladas de Venenos de Subespécies de *Crotalus durissus* e suas múltiplas atividades biológicas. **Scientia Amazonia**, v. 3, n. 2, 2014.

DOS-SANTOS, M. C.; ASSIS, E. B.; MOREIRA, T. D.; PINHEIRO, J.; FORTES-DIAS, C. L. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 958-961, 2005.

DOS-SANTOS, M. C.; FERREIRA, L. C. L.; DA SILVA, W. D.; FURTADO, M. D. F. D. Caracterización de las actividades biológicas de los venenos 'amarillo' y 'blanco' de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 31, n. 11, p. 1459-1469, 1993.

DOS-SANTOS, M. C.; MORHY, L.; FERREIRA, L. C. L.; OLIVEIRA, E. B. Purification and properties of a crotoxin analog from *Crotalus durissus ruruima* venom. **Toxicon**, v. 31, n. 2, p. 166-166, 1993.

FADEL, V.; BETTENDORFF, P.; HERRMANN, T.; DE AZEVEDO JR, W. F.; OLIVEIRA, E. B.; YAMANE, T.; WÜTHRICH, K. Automated NMR structure determination and disulfide bond identification of the myotoxin crotoxin from *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 46, n. 7, p. 759-767, 2005.

FERREIRA, B. L. **Identificação da atividade antibiótica e relação estrutura atividade de moléculas de origem sintética e animal**. 2007. Dissertação (Mestrado em Neuroimunologia). Universidade Federal Fluminense, Niterói, 2007.

FONSECA, F. V. **Modificação estrutural de PLA2 de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis* com p-bromofenacil e cumarinas sintéticas – Caracterização bioquímica e biológica**.



Estudo da agregação plaquetária e efeito edematogênico. 2011. Tese (Doutorado). Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2011.

GLASER, H. S. R. Bactericidal Activity of Crotalus Venom in Vitro. **Copeia**, v. 1948, n. 4, p. 245-247, 1948.

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

HAN, R.; LIANG, H.; QIN, Z.; LIU, C. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38 MAPK signaling pathway. **Acta Pharmacologica Sinica**, v. 35, p. 1323-1332, 2014.

HAYASHI, M. A. F.; NASCIMENTO, F. D.; KERKIS, A.; OLIVEIRA, V.; OLIVEIRA, E. B.; PEREIRA, A.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; NADER, H. B.; YAMANE, T.; KERKIS, I.; TERSARIOL, I. L. S. Cytotoxic effects of crotoxin are mediated through lysosomal membrane permeabilization. **Toxicon**, v. 52, n. 3, p. 508-517, 2008.

HEINEMANN, J. A.; ANKENBAUER, R. G.; AMÁBILE-CUEVAS, C. F. Do antibiotics maintain antibiotic resistance? **Drug Discovery Today**, v. 5, p. 195-204, 2000.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc Natl Acad Sci**, v. 68, p. 1560-1563, 1971.

JORGE, M. T.; RIBEIRO, L. A. Epidemiologia e quadro clínico do acidente por cascavel sul-americana (*Crotalus durissus*). **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 34, p. 347-354, 1992.

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

KUMAR, S.; SARKAR, P.; JAIN, R. Venoms can be a boon for cancer patients. **Forum on Immunopathological diseases and Therapeutics**, v. 4, p. 255-273, 2013.

LAURE, C. J. [The primary structure of crotoxin (author's transl)]. **Hoppe Seylers Z Physiol Chem**, v. 356, n. 2, p. 213-215, 1975.

MALUF, S. C.; MAS, C. D.; OLIVEIRA, E. B.; MELO, P. M.; CARMONA, A. K.; GAZARINI, M. L.; HAYASHI, M. A. F. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotoxin, a cell penetrating peptide from the snake venom. **Peptides**, v. 78, p. 11-16, 2016.

MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; HAVT, A.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1165-1171, 2002.

MATAVEL, A. C. S.; FERREIRA-ALVES, D. L.; BEIRÃO, P. S. L.; CRUZ, J. S. Tension generation and increase in voltage-activated Na⁺ current by crotoxin. **European Journal of Pharmacology**, v. 348, n. 2-3, p. 167-173, 1998.

MELLO, L. E. A. M.; CAVALHEIRO, E. A. Behavioural, electroencephalographic and neuropathological effects of the intrahippocampal injection of the venom of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). **Toxicon**, v. 27, n. 2, p. 189-199, 1989.

MULLER, V. D. M.; RUSSO, R. R.; OLIVEIRA CINTRA, A. C.; SARTIM, M. A.; DE MELO ALVES-PAIVA, R.; FIGUEIREDO, L. T. M.; SAMPAIO, S. V.; AQUINO, V. H. Crotoxin and phospholipases A₂ from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507-515, 2012.

NEVES, M. S.; SOUSA, D. R. T.; SOCORRO, M. P.; FERREIRA, B. C.; FROTA, M. Z. M.; SOUZA, J. V. B.; LOZANO, L. L. L. Evaluation of antifungal activity of snake venoms from the Amazon forest. **Journal of Yeast and Fungal Research**, v. 6, n. 2, p. 11-16, 2015.

NEWMAN, D. J.; CRAGG, G. M. Natural Products as Sources of New Drugs over the Last 25 Years. **Journal of Natural Products**, v. 70, n. 3, p. 461-477, 2007.

NUNES, F. P. B.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R. C.; CIRILLO, M. C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus*



durissus terrificus snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100-1106, 2010.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; AFFONSO, R.; ZHANG, G. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotoamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 327-331, 2011.

PEREIRA, A.; KERKIS, A.; HAYASHI, M. A. F.; PEREIRA, A. S. P.; SILVA, F. S.; OLIVEIRA, E. B.; SILVA, A. R. B. P.; YAMANE, T.; RÁDIS-BAPTISTA, G.; KERKIS, I. Crotoamine toxicity and efficacy in mouse models of melanoma. **Expert Opin Investig Drugs**, v. 20, n. 9, p. 1189-1200, 2011.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47, p. 24-29, 2001.

PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; ROMERO-VARGAS, F. F.; WINCK, F. V.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of Two PLA2 Isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* Snake Venom. **The Protein Journal**, v. 26, n. 1, p. 39-49, 2007.

QUEIROZ, S. J. **Identificação da atividade antimicrobiana no veneno da serpente *Bothrops moojeni* em bactérias gram negativas**. 2010. Dissertação (Mestrado em Ciências Ambientais e Saúde), Pontifícia Universidade Católica de Goiás, Goiás, 2010.

QUINTANA, J. C.; CHACÓN, A. M.; VARGAS, L.; SEGURA, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ALARCÓN, J. C. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. **Acta Tropica**, v. 124, n. 2, p. 126-132, 2012

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S. Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology Part C: Toxicology & Pharmacology**, v. 142, n. 3-4, p. 328-346, 2006.

RANGEL-SANTOS, A.; DOS-SANTOS, E. C.; LOPES-FERREIRA, M.; LIMA, C.; CARDOSO, D. F.; MOTA, I. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus*

cascavella and *Crotalus durissus collilineatus*. **Toxicon**, v. 43, n. 7, p. 801-810, 2004.

RUDD, C. J.; VISKATIS, L. J.; VIDAL, J. C.; ETCHEVERRY, M. A. In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. **Investigational New Drugs**, v. 12, n. 3, p. 183-184, 1994.

SANTOS, N. Q. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. **Texto Contexto Enferm**, v. 13, p. 64-70, 2004.

SLOTTA, K. H.; FRAENKEL-CONRAT, H. Two Active Proteins from Rattlesnake Venom. **Nature**, v. 142, p. 213-213, 1938.

SOARES, M.; PUJATTI, P.; FORTES-DIAS, C.; ANTONELLI, L.; SANTOS, R. *Crotalus durissus terrificus* venom as a source of antitumoral agents. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, p. 480-492, 2010.

TAMIETI, B. P.; DAMATTA, R. A.; COGO, J. C.; DA SILVA, N. S.; MITTMANN, J.; PACHECO-SOARES, C. Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nucleus alterations in CHO-K1 cell line after *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom treatment. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 13, p. 56-68, 2007.

TOYAMA, M. H.; DE OLIVEIRA, D. G.; BERIAM, L. O. S.; NOVELLO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1033-1038, 2003.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 47-57, 2006.

VARGAS, F. F. R. **Modificações químicas de fosfolipases A2 procedentes do veneno de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis*: estudos dos efeitos catalíticos e farmacológicos**. 2007. Dissertação (Mestrado), Instituto de Biologia,



Universidade Estadual de Campinas, Campinas, 2007.

VARGAS, L. J.; QUINTANA, J. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; SANZ, L.; CALVETE, J. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon**, v. 64, p. 1-11, 2013.

YAMANE, E. S.; BIZERRA, F. C.; OLIVEIRA, E. B.; MOREIRA, J. T.; RAJABI, M.; NUNES, G. L. C.; DE SOUZA, A. O.; DA SILVA, I. D. C. G.; YAMANE, T.; KARPEL, R. L.; SILVA JR, P. I.; HAYASHI, M. A. F. Unraveling the antifungal activity of a South American rattlesnake toxin crotamine. **Biochimie**, v. 95, n. 2, p. 231-240, 2013.

YAN, C.-H.; LIANG, Z.-Q.; GU, Z.-L.; YANG, Y.-P.; REID, P.; QIN, Z.-H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death

of K562 cells. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 521-530, 2006.

ZAMBELLI, V. O.; SAMPAIO, S. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; GRECO, K.; BRITTO, L. R. G.; ALVES, A. S.; ZYCHAR, B. C.; GONÇALVES, L. R. C.; SPADACCI-MORENA, D. D.; OTTON, R.; DELLA-CASA, M. S.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxigenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-1367, 2008.

ZHANG, H.-L.; HAN, R.; CHEN, Z.-X.; CHEN, B.-W.; GU, Z.-L.; REID, P. F.; RAYMOND, L. N.; QIN, Z.-H. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 175-182, 2006.

1. OBJETIVOS

1.1. Objetivo geral

Avaliar o potencial antibacteriano e antitumoral dos venenos individuais, variedade “amarela” e “branca” da serpente amazônica *Crotalus durissus ruruima*.

1.2. Objetivos específicos

- 1) Verificar a atividade antibacteriana dos venenos brutos das variedades “amarela” e “branca” de *Crotalus durissus ruruima* frente às bactérias gram-negativas e gram-positivas - **Capítulo II;**
- 2) Avaliar o efeito citotóxico dos venenos brutos das variedades “amarela” e “branca” de *Crotalus durissus ruruima* em linhagens de células de fibroblasto humano (MCR-5) em linhagens tumorais de melanoma (SK-Mel 103), adenocarcinoma de mama (MCF-7) e carcinoma colorretal (HCT-116) - **Capítulo II;**
- 3) Determinar as atividades fosfolipásica A₂, coagulante e “trombin-like” das frações isoladas dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69 de *Crotalus durissus ruruima* – **Capítulo III;**
- 4) Avaliar o efeito citotóxico e antibacteriano das frações isoladas de Cdr68 e de Cdr69 em linhagens de células de fibroblasto humano (MCR5) e carcinoma colorretal (HCT116) – **Capítulo III;**

CAPÍTULO II

Atividade antitumoral e antibacteriana dos venenos individuais,
variedades branca e amarela, de *Crotalus durissus ruruima*

Artigo escrito de acordo com as normas da revista *Toxicon* (ISSN 0041-0101), o qual deverá ser submetido após a avaliação dos membros da banca e tradução para língua inglesa.

Atividade antitumoral e antibacteriana dos venenos individuais,
variedades branca e amarela de *Crotalus durissus ruruima*.

Ilia Gilmar Carvalho dos Santos^{a,b,*}; Maria Carolina Scheffer de Souza^a; Patrícia Danielle Oliveira de Almeida^c; Leilane Bentes de Sousa^c; Aguyda Rayany Cavalcante Barbosa^d; Juliana Varjão Lameiras^{a,b}; Marne Carvalho de Vasconcellos^c; Cecília Verônica Nunez^e; Antônio Luiz Ribeiro Boechat Lopes^b; Consuelo Latorre Fortes-Dias^f; Maria Cristina Dos-Santos^{a,b}

^a*Programa Multi-institucional de Pós-Graduação em Biotecnologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.*

^b*Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.*

^c*Laboratório de atividade Biológica, Faculdade de Ciências Farmacêuticas, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil*

^d*Programa de Pós-Graduação em Imunologia Básica e Aplicada, Laboratory of Infectious Disease and Immunology (IDI), Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, 69077-000, Brazil.*

^e*Laboratório de Bioprospeção e Biotecnologia, Coordenação de Tecnologia e Inovação, Instituto Nacional de Pesquisas da Amazônia, Manaus, AM, 69067-375, Brazil.*

^f*Serviço de Enzimologia, Diretoria de Pesquisa e Desenvolvimento, Fundação Ezequiel Dias, Belo Horizonte, MG, 30510-010, Brazil.*

*Corresponding author: Tel.: +55092992003719; E-mail – iliagilmara@hotmail.com
Programa Multi-institucional de Pós-graduação em Biotecnologia, Laboratório de Imunoquímica, Departamento de Parasitologia, Instituto de Ciências Biológicas, Universidade Federal do Amazonas, Av. General Octávio Jordão Ramos, 3000, Japiim, CEP 69057-000.

Resumo

Os venenos animais constituem uma das mais ricas fontes de substâncias biologicamente ativas encontradas na natureza. Estudos farmacológicos e bioquímicos, realizados nas últimas décadas, têm mostrado a riqueza de proteínas com atividade enzimática, toxinas, peptídeos, amins bioativas, dentre outros compostos, encontrados nos venenos de serpentes, bem como a grande diversidade de suas ações. O estudo desses venenos se mostra uma ferramenta importante no desenvolvimento de protótipos de novas drogas. O objetivo deste trabalho foi avaliar o potencial antibacteriano e antitumoral dos venenos individuais, variedade ‘amarela’ (Cdr68 e Cdr69) e ‘branca’ (Cdr110 e Cdr173) da cascavel Amazônica *Crotalus durissus ruruima*. A avaliação da atividade antimicrobiana dos venenos foi realizada frente às bactérias gram-positivas (*Staphylococcus aureus* e *Staphylococcus epidermidis*) e gram-negativas (*Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*). Os venenos amarelos apresentaram atividade antibacteriana frente à bactéria *Staphylococcus aureus*. A ação citotóxica dos venenos foi avaliada pelo método de alamar blue nas seguintes linhagens celulares: SK-Mel 103, MCF-7, HCT-116, MCR-5 e THP-1. O pool de venenos amarelos Cdr68+Cdr69 apresentou citotoxicidade contra todas as linhagens tumorais testadas, mostrando valores de CI_{50} que variaram de 9,39 $\mu\text{g/mL}$ para células MCF-7 a 4,21 para MRC-5 e para células HCT-116 não foi possível obter o CI_{50} , pois o valor estava abaixo da menor concentração estudada (1,56 $\mu\text{g/mL}$). Quando avaliados individualmente, Cdr68 e Cdr69 apresentaram CI_{50} em células HCT-116 de 1,8 $\mu\text{g/mL}$ e 1,3 $\mu\text{g/mL}$ respectivamente.

Os venenos brancos Cdr110 e Cdr173 não apresentaram efeito citotóxico para as linhagens testadas. A genotoxicidade foi avaliada pelo ensaio do cometa, usando duas versões, a de pH alcalino e a de pH neutro. Por meio da análise do Índice de dano (ID) em células HCT-116, foi observado que Cdr68 e Cdr69 apresentaram ID superiores ao do controle positivo, com diferença estatística significativa, inclusive com danos de classe 4, evidenciando que os venenos causam dano ao DNA, e ainda, quebra de cadeia dupla do DNA destas células. Assim, conclui-se que existe uma variabilidade intrapopulacional em venenos de *C. d. ruruima* e que, diferentemente dos venenos brancos, os venenos amarelos tem atividade antimicrobiana, são citotóxicos e genotóxicos para linhagens tumorais. Estes achados indicam que os venenos podem ser fonte de componentes para o desenvolvimento de novos produtos farmacêuticos com potencial uso terapêutico no combate ao câncer colorretal.

Palavras-chaves: cascavel Amazônica, venenos, citotoxicidade, anti-*Staphylococcus aureus*

1. Introdução

O câncer é um problema sério de saúde pública e causou a morte de 8,8 milhões de pessoas, em 2015, em todo o mundo (WHO, 2017). Várias terapias são utilizadas para o tratamento dessa desordem, como a radiação, cirurgia, quimioterapia, imunoterapia e terapia hormonal, sendo que o uso de quimioterápicos é a opção predominante nos dias atuais. No entanto, um dos principais obstáculos é que os pacientes muitas vezes não respondem ou, eventualmente, desenvolvem resistência após o tratamento inicial, além dos sérios efeitos colaterais resultantes da quimioterapia (Kumar et al., 2013).

Outra grande preocupação dos órgãos de saúde pública são as infecções bacterianas, que estão entre as dez principais causas de morte em todo o mundo. A resistência de certos agentes patogênicos clinicamente importantes é decorrente do uso indiscriminado de antimicrobianos e tem sido considerada o principal fator do aumento da morbidade e mortalidade dessas infecções (Santos, 2004). Por exemplo, a bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*, comumente encontrada no epitélio escamoso das narinas, atualmente apresenta resistência à metilcolina, antibiótico amplamente utilizado no tratamento dessas infecções (Lowy, 1998; Foster, 2004).

Neste contexto, surge a busca urgente por novos fármacos, potentes e menos tóxicos, a partir de fontes naturais tanto para o tratamento dos diversos agentes infecciosos quanto para células tumorais. Estudos têm mostrado várias classes promissoras de moléculas naturais, como proteínas e peptídeos obtidos de venenos de escorpiões (Conde et al., 2000), aranhas (Benli and Yigit, 2008), abelhas (Hegazi et al., 2015), vespas (Jalaei et al., 2014) e serpentes, com atividade tóxica sobre patógenos e células tumorais (Koh et al., 2006; Perumal Samy et al., 2006; Kumar et al., 2013; Perumal Samy et al., 2017).

Pesquisadores têm concentrado esforços na caracterização da estrutura de proteínas de venenos de serpentes com atividades biológicas potenciais, que possam levar à produção de novos medicamentos (White, 2000).

No Brasil, país rico em biodiversidade cuja fauna e flora representam aproximadamente 13% da biota do planeta (Mittermeier et al., 2005), ocorrem vários gêneros e espécies de serpentes das famílias Elapidae, Viperidae e Colubridae. Dentre essas, destacam-se as subespécies da cascavel *Crotalus durissus* cujos venenos são fontes de agentes biologicamente ativos com atividade antifúngica, antileishmaniótica, antiplasmódica, antiviral, antibacteriana ou antitumoral (Diz Filho et al., 2009; Soares et al., 2010; Barros et al., 2011; Muller et al., 2012; Quintana et al., 2012; Vargas et al., 2013; Barros et al., 2015; Neves et al., 2015).

Os venenos ou toxinas isoladas de *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel sul-americana, conferiram resistência às células Vero E6, contra as infecções por vírus dengue e febre amarela (Muller et al., 2012) e também, o veneno, apresentou atividade antiparasitária, inibindo o desenvolvimento de *Plasmodium falciparum* em um mecanismo dose dependente (Maluf et al., 2016).

O efeito citotóxico de frações isoladas do veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi avaliado em vários trabalhos frente às seguintes linhagens de células tumorais: de eritroleucemia de murinos (MEL), Hs578T (ducto mamário humano), SK-LU-1 (adenocarcinoma pulmonar), CHO-K1 (ovariano de hamster) CHO-K1, RT2 (glioblastoma), GH3 (adenoma benigno de pituitária), SK-MES-1 (pulmonar humano) (Corin et al., 1993; Rudd et al., 1994; Da Silva et al., 1997; Tamietti et al., 2007; Soares et al., 2010; Han et al., 2014).

Da peçonha de *Crotalus durissus cascavella*, a cascavel encontrada na Região Nordeste do Brasil, foi isolada a enzima L-amino ácido oxidase (LAO) que apresentou

atividade contra a bactéria gram-negativa *Xanthomonas axonopodis* pv *passiflorae*, gram-positiva *Streptococcus mutans* e também contra formas promastígotas de *Leishmania amazonensis*, *in vitro* (Toyama et al., 2006).

As serpentes da subespécie *Crotalus durissus ruruima*, a cascavel da região Norte do Brasil, secretam venenos de duas variedades, branca ou amarela. As atividades biológicas desencadeadas pela mistura de venenos da variedade ‘branca’ foram letal, coagulante, miotóxica, edematogênica e miolítica. A mistura de venenos da variedade ‘amarela’, além das atividades apresentadas pela ‘branca’, induziu hemorragia local, necrose e atividade caseinolítica (Dos-Santos et al., 1993). Os venenos que compuseram essas misturas foram testados individualmente e apresentaram diferenças de atividades biológicas além de intensidades distintas, demonstrando a existência de variabilidade intrapopulacional para os venenos de *C. d. ruruima* (Dos-Santos et al., 2005).

Visando a busca de novos bioativos, o presente trabalho teve por objetivos avaliar a atividade antitumoral e antimicrobiana de venenos individuais das variedades branca (Cdr110 e 173) e amarela (Cdr 68 e 69) de *Crotalus durissus ruruima*, que tiveram outras atividades biológicas testadas (Dos-Santos et al., 2005).

2. Material e Métodos

2.1. Venenos

Os venenos foram obtidos de quatro serpentes adultas da subespécie *Crotalus durissus ruruima* procedentes de Boa Vista (RR) e mantidas no Núcleo de Animais Peçonhentos, do Instituto de Medicina Tropical do Amazonas. Para a extração dos venenos as serpentes foram anestesiadas com vapor de gás carbônico. Os venenos foram coletados individualmente, separados de acordo com a coloração ‘branca’ ou ‘amarela’, filtrados em filtros de 0,45µm, liofilizados e estocados a -20°C. Os venenos variedade amarela foram identificados como Cdr68 e Cdr69 e os venenos variedade branca como Cdr110 e Cdr173.

O pool de veneno de *Crotalus durissus terrificus* foi proveniente de serpentes da região de Minas Gerais e identificado como Cdt.

2.2. Avaliação do potencial citotóxico – *in vitro*

2.2.1. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue

O ensaio de Alamar Blue foi realizado segundo metodologia descrita por Ahmed et al. (1994), em microplacas de 96 poços. As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco®, Life Technologies, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino (FBS) (Gibco®, Life Technologies, EUA), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) e mantidas a 37°C, em estufa a 5% de CO₂. A fim de determinar os valores de CI₅₀, células plaqueadas na concentração de 5x10³ células/poço foram tratadas com os venenos nas concentrações de 100 a 1,56 µg/mL, em triplicata. Como controle positivo de morte celular, foi usada a Doxorubicina (5 µg/mL) (Sigma) e como o controle negativo foi usado o meio de cultura (dilúente das amostras). Após 72 horas de tratamento, 10 µL da solução de Alamar Blue® (Sigma) a 0,4% foi adicionado em cada poço da placa e, após 2h de exposição, a fluorescência foi medida em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter).

A citotoxicidade foi avaliada, inicialmente, com amostras individuais de Cdr110, Cdr173, Cdt e um “pool” dos venenos Cdr68+Cdr69, em três linhagens tumorais humanas - melanoma (SK-Mel 103); carcinoma colorretal (HCT-116); adenocarcinoma de mama (MCF-7) e duas linhagens não tumorais humanas: fibroblastos (MRC-5) e monócitos (THP-1). Em seguida os venenos Cdr68 e Cdr69 foram testados individualmente em células de carcinoma colorretal (HCT 116) e fibroblastos (MRC5) em concentrações de 10 a 0,15 µg/mL.

2.2.2. Avaliação da citotoxicidade pelo método MTT

A linhagem celular de monócitos humanos THP-1, foi cultivada em atmosfera úmida, a 37°C, contendo 5% de CO₂, em meio RPMI 1640 (Gibco®, Life Technologies, EUA)

suplementados com 10% de SFB (Gibco®, Life Technologies, EUA), (1%) 2mM de L-glutamina, penicilina/estreptomicina a 1% (Gibco®, Life Technologies, EUA). Para induzir a diferenciação dos monócitos em células aderentes, macrófagos, as células foram ressuspensas em meio fresco contendo forbol 12-miristato-13-acetato (PMA) a 200ng/mL. As células foram distribuídas, nos 96 poços da placa, a uma densidade de 100.000 células/poço e incubadas por 48 horas. Os macrófagos foram lavados com meio fresco e deixado em repouso durante 2 dias, com troca de meio diariamente.

As células THP-1 foram tratadas com 1, 10, 100 e 1000µg dos venenos Cdr68, Cdr69, Cdr110, Cdr173 ou Cdt durante 48 h. Os controles foram tratados com Staurosporine 5 µM, Dimetilsulfóxido (DMSO) ou meio. Após o período de tratamento, os meios contendo os venenos e os controles foram removidos e adicionou-se 90µL de meio de cultura RPMI e 10µL de MTT (5mg/mL) em cada poço. As células foram incubadas durante 3h e a solução foi, em seguida, removida. Adicionou 100µL de DMSO e a placa foi deixada por 20 minutos sobre agitação, para total dissolução dos cristais de formazana.

A leitura foi feita em leitor de ELISA, com absorvância de 560nm, sendo linearmente proporcional ao número de células vivas.

2.3. Avaliação da genotoxicidade – Ensaio cometa

O ensaio cometa foi realizado nas versões alcalina e neutra conforme metodologia descrita por Singh et al. (1988). Células de MRC-5 ou HCT-116 (2×10^5) foram plaqueadas em placas de 24 poços. Após 24 horas de adesão, as células foram tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69 nas concentrações de 3 µg/mL; DMSO 0,2% (controle negativo) e Doxorrubicina 5 µg/mL (controle positivo) por 3 horas. O ensaio foi realizado utilizando 10 µL da suspensão de células, após o tratamento, e homogeneizados com 100 µL de agarose de baixo ponto de fusão 0,5% (Sigma), dissolvida em tampão fosfato salina (PBS) pH 7,4. A

suspensão de células em agarose foi espalhada em lâminas de microscópio previamente preparadas com agarose (1,5%) de ponto de fusão normal. As células foram cobertas com uma lamínula e mantidas a 4°C por 5 minutos. Após esta etapa, as lamínulas foram removidas e as lâminas foram imersas em solução de lise contendo 2,5 M NaCl, 100 mM EDTA, 1% Triton X-100, 10 mM Tris pH 10, por 24 horas, a 4°C. Após a lise, as lâminas foram submetidas a uma eletroforese em tampão 300 mM NaOH e 1mM EDTA em pH 13, por 20 minutos (20 V ou 300 mA). Após corrida, as lâminas foram lavadas em tampão de neutralização (0,4 M Tris-HCl pH 7,5) por 15 minutos. As lâminas foram secas a temperatura ambiente, imersas em etanol por 3 minutos e novamente secas a temperatura ambiente.

Os procedimentos para o ensaio do cometa em pH neutro foram iguais aos realizados para o cometa alcalino, com exceção da solução de eletroforese, a qual foi preparada com Acetado de sódio e Tris-HCl, pH 8,5 e a corrida por 20 min, a 25 V ou corrente de 300 mA (Wojewódzka et al., 2002). Cada lâmina foi marcada com 50 µL de brometo de etídio (20 µg/mL) e analisada imediatamente em microscópio de fluorescência LEICA. Todas as etapas foram realizadas ao abrigo de luz.

2.4. Análise morfológica pela coloração por hematoxilina e eosina.

O estudo da morfologia celular foi realizado segundo metodologia descrita por Wang et al. (2009). As células HCT-116 foram semeadas em placas de 24 poços (7×10^4 células/mL). Após 24 horas, as células foram tratadas com Cdr68 e Cdr69 nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL. Após o período de incubação de 72 horas as células foram tripsinizadas e uma alíquota (100 µL) de cada amostra foi citocentrifugada a 2000 rpm por 5 minutos. A fixação das células foi realizada com metanol por 1 minuto, as lâminas foram coradas com hematoxilina e eosina. As alterações morfológicas foram analisadas por microscopia óptica (Eclipse Ni, Nikon) utilizando o software Nis-Elements 4.30.01 (Nikon).

2.5. Avaliação da atividade antimicrobiana

2.5.1. Ensaio de atividade antimicrobiana pelo método de difusão do disco

Para os ensaios da atividade antimicrobiana foram utilizadas as seguintes bactérias, obtidas da American Type Culture Collection (ATCC): Gram-negativas: *Pseudomonas aeruginosa* ATCC 27853, *Escherichia coli* ATCC 25922, *Klebsiella pneumoniae* ATCC 700603. Gram-positiva: *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 e *Staphylococcus epidermidis* ATCC 12228.

O método de difusão em ágar, utilizando discos contendo os venenos brutos Cdr68, Cdr69, Cdr110 e Cdr173 foi realizado conforme descrito por Bauer et al. (1966) e Clinical and Laboratory Standards Institute (2012).

Os inóculos foram preparados em solução salina a 0,85%, pelo método de suspensão direto da colônia. A turvação do inóculo foi comparada e ajustada à turvação do tubo 0,5 da escala de MacFarland.

Após a homogeneização, o inóculo foi semeado em meio de cultura ágar Mueller-Hinton (DIFCO). Em seguida, os discos contendo os venenos e os controles foram aplicados sobre a superfície do ágar. As placas foram incubadas a 35°C ($\pm 2^\circ\text{C}$), por 24h.

A presença de halo de inibição do crescimento microbiano em torno do disco foi considerada como atividade antimicrobiana. O diâmetro das zonas de inibição foi medido em mm. Todos os ensaios foram desenvolvidos em triplicata e a atividade expressa pela média dos diâmetros dos halos de inibição, para uma dada concentração.

2.5.2. Teste de microdiluição

Os venenos que apresentaram atividade antimicrobiana no ensaio de disco difusão foram submetidos ao teste de microdiluição diluição em caldo (Eloff, 1998; Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003). Diluições seriadas dos venenos Cdr68 e Cdr69 foram feitas (1000 a 0,12 $\mu\text{g/mL}$), e em seguida, 95 μL de cada diluição foram adicionados em cada

poço da placa. Logo após, a bactéria *Staphylococcus aureus* ATCC 25923 (5 µL) foi inoculada, a turvação do inóculo foi comparada e ajustada à turvação do tubo 0,5 da escala de MacFarland e diluído 10 vezes. As placas foram incubadas a 37°C 24 horas. Após esse período, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 625nm.

2.6. Análises Estatísticas

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para comparação das médias foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) “One-Way” seguido do pós-teste de Tukey. A determinação do valor de CI_{50} (índice de citotoxicidade que causa a morte celular de 50%) foi realizada por teste de regressão não-linear. As análises foram realizadas no software GraphPad Prism 6.0. O nível de significância adotado foi de $p < 0,05$.

3. Resultados

3.1. Avaliação da citotoxicidade.

O pool de venenos amarelos Cdr68+Cdr69 apresentou citotoxicidade contra todas as linhagens tumorais testadas, mostrando valores de CI_{50} (Tabela 1), que variaram de 9,39 µg/mL para células de adenocarcinoma de mama (MCF-7) a <1,56 µg/mL para células de carcinoma colorretal (HCT-116).

Ao avaliar a atividade citotóxica do pool de Cdr68+Cdr69 sobre células normais de fibroblasto humano (MRC-5) foi encontrado valor de CI_{50} de 4,21 µg/mL, mostrando que o pool de Cdr68+Cdr69 foi menos tóxico que a doxorrubicina, cuja CI_{50} foi de 0,14 µg/mL.

Quando os venenos Cdr68 e Cdr69 foram testados individualmente em concentrações menores (10 a 0,15 µg/mL) frente à linhagem tumoral de HCT-116 (Fig.1) apresentam atividade citotóxica semelhante, o Cdr68 apresentou CI_{50} de 1,8 µg/mL (1,5-2,2) e Cdr69 CI_{50} de 1,3 (1,1 - 1,5). A atividade citotóxica concentração dependente.

Tabela 1. Atividade citotóxica in vitro dos venenos, variedades branca e amarela, de *Crotalus durissus ruruima* frente à linhagem de células normais de fibroblasto humano (MRC-5) e linhagens de células tumorais: Melanoma (SK-Mel-103), Adenocarcinoma de mama (MCF-7), Carcinoma colorretal (HCT-116) e células THP-1.

Venenos	MRC-5	MCF-7	HCT-116	SK-Mel-103	THP-1
	CI ₅₀ (µg/mL)				
Cdr110	>100	>100	>100	>100	>1000
Cdr173	>100	>100	>100	>100	>1000
Cdt	>100	>100	>100	>100	>1000
Cdr68+Cdr69	4,21 (3,96 - 4,48)	9,39 (8,980 - 9,819)	n.d	5,43 (4,491 - 6,581)	-
Cdr68	-	-	1,8 (1,5-2,2)	-	508,3 (284,1- 909,3)
Cdr69	-	-	1,3 (1,1 - 1,5)	-	532,8 (316,8-896,0)
Doxorrubicina	0,14 (0,10 - 0,17)	0,84 (0,50 - 1,43)	0,52 (0,27 - 0,97)	0,90 (0,29 - 1,80)	-

Resultados expressos em CI₅₀ com Intervalo de confiança 95%
n.d. não determinado

3.2. Avaliação da genotoxicidade – Ensaio cometa

Os venenos Cdr68 e Cdr69 (3µg/mL) foram testados para avaliar a capacidade de causar danos ao DNA, frente as linhagens: não tumoral MRC-5 ou tumoral HCT-116, utilizando a versão em pH alcalino e pH neutro.

Em células MRC-5, tratadas com Cdr68 e Cdr69, foi observado um aumento significativo do índice de dano (ID) sob pH alcalino, quando comparados ao controle negativo ($p < 0,0001$), porém quando comparadas ao controle positivo apresentaram menor ID, sendo estatisticamente diferentes ($p < 0,0001$). O veneno Cdr69 apresentou maior potencial genotóxico que o Cdr68 ($p = 0,0185$). Em pH neutro o tratamento com os venenos causou danos ao DNA, havendo diferença estatística significativa, quando comparados ao controle negativo ($p < 0,0001$). Não houve diferença estatística entre o controle positivo e o Cdr68, ($p > 0,05$) (Figura 1). Em cometa alcalino os tipos de danos mais frequentes foram de classe 1, no tratamento com os venenos, enquanto a doxorrubicina apresentou principalmente danos de

classe 2. Em cometa neutro os venenos apresentaram predominantemente danos de classe 2, enquanto a doxorrubicina apresentou danos de classe 3 (Figura 2).

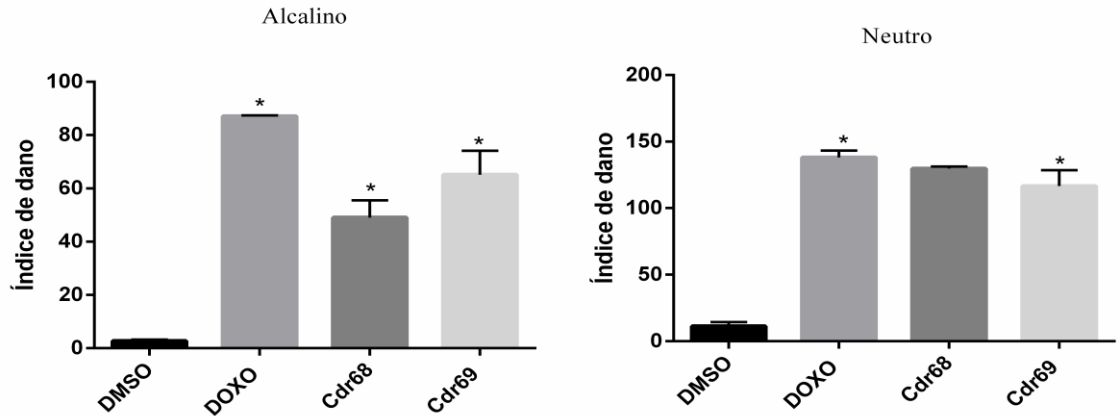


Figura 1. Índice de dano de células MRC-5, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69. Em cometa alcalino os venenos apresentaram menor índice de dano quando comparados ao controle positivo, já em cometa neutro o veneno Cdr69 apresentou índice de danos menor que o controle positivo. Doxo – Doxorrubicina controle positivo. DMSO- Dimetilsulfóxido controle negativo.

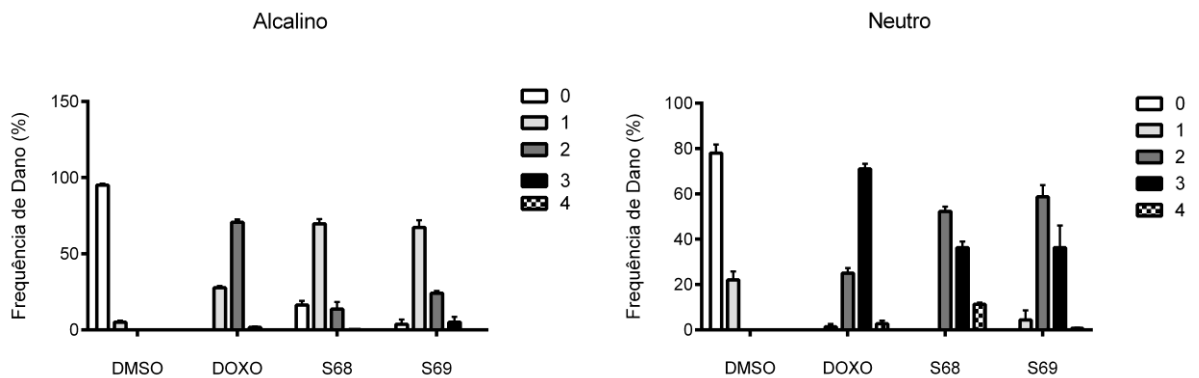


Figura 2. Frequência e distribuição das classes de danos em células MRC-5, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69. Os venenos apresentaram maior frequência de danos de classes 1 em cometa alcalino e danos de classes 2 em cometa neutro. Doxo – Doxorrubicina controle positivo. DMSO- Dimetilsulfóxido controle negativo.

Em células HCT-116, tanto em cometa neutro como alcalino, foi observado um aumento significativo no ID das células tratadas com os venenos quando comparados aos controles positivo e negativo ($p < 0,0001$). Quando comparados o Cdr68 apresentou maior

potencial genotóxico do que o Cdr69 ($p < 0,0001$) em cometa alcalino, sendo que em cometa neutro não houve diferença entre ambos (Figura 3). Os danos mais frequentes foram de classe 2 e 3, no tratamento com os venenos, enquanto a doxorubicina apresentou principalmente danos de classe 2, em cometa alcalino. Em cometa neutro as células tratadas com venenos apresentaram predominantemente danos de classe 4 e a doxorubicina apresentou danos de classe 3 (Figura 4).

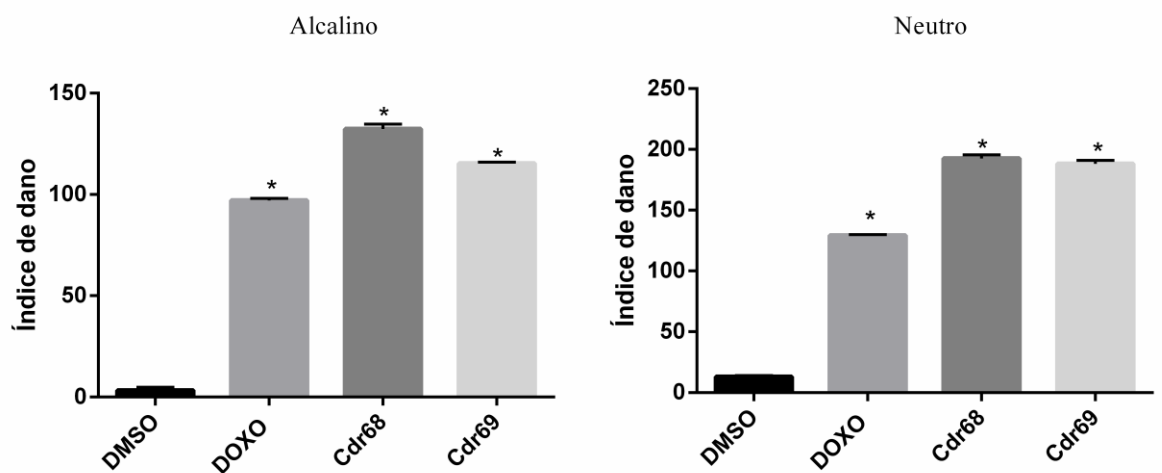


Figura 3. Índice de dano de células HCT-116, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69. Tanto em cometa neutro quanto em cometa alcalino os venenos apresentaram maior índice de dano quando comparados ao controle positivo. Doxo – Doxorubicina controle positivo. DMSO- Dimetilsulfóxido controle negativo.

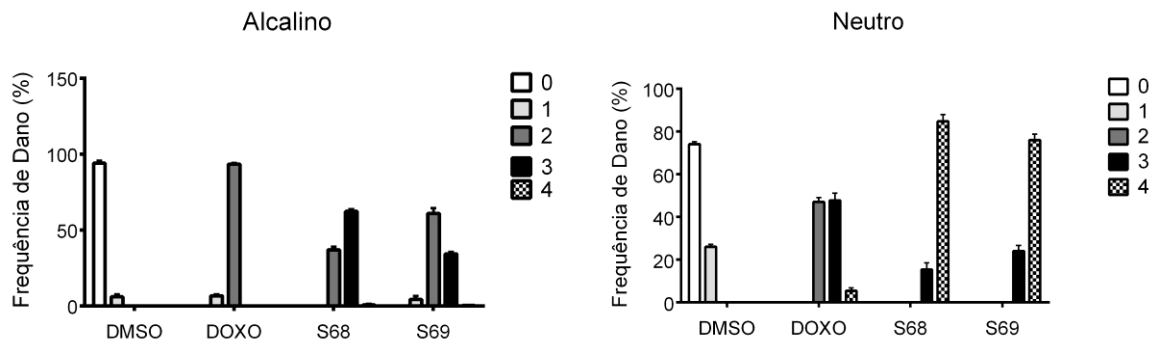


Figura 4. Frequência e distribuição das classes de danos em células HCT-116, em cometa alcalino e neutro, tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69. Os venenos apresentaram maior frequência de danos de classes 2 e 3 em cometa alcalino e danos de classes 4 em cometa neutro. Doxo – Doxorubicina controle positivo. DMSO-Dimetilsulfóxido controle negativo.

3.3. Análise morfológica pela coloração por hematoxilina e eosina

A exposição de células HCT-116 a Cdr68 ou Cdr69 por 72 horas, causou alterações morfológicas como: encolhimento das células, núcleo picnótico, condensação da cromatina, vacuolização do citoplasma e, em alguns casos, restos celulares, demonstrando a destruição das células (Figura 5).

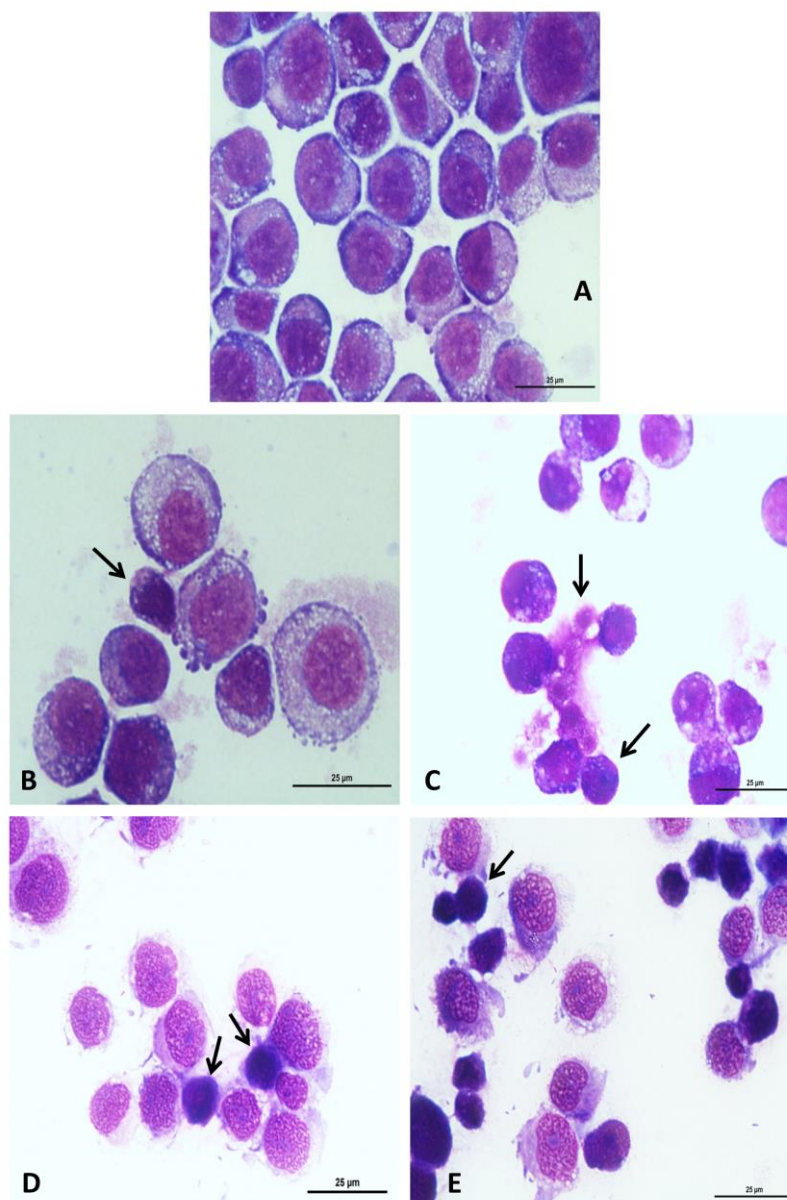


Figura 5. Imagens da morfologia das células HCT-116 após 72 horas de tratamento com Cdr68 ou Cdr69, coradas com hematoxilina e eosina. Células visualizadas por microscopia óptica. (A) controle negativo, (B e C) células tratadas com Cdr68 nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente, (D e E) células tratadas com Cdr69 nas concentrações de 0,5 e 5 µg/mL, respectivamente. As setas indicam as alterações observadas.

3.4. Atividade Antimicrobiana

Os valores dos halos em milímetros \pm desvio padrão dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69 foram $9,6 \pm 1,52$ e $10,6 \pm 0,57$ respectivamente para a cepa de *Staphylococcus aureus* ATCC 25923. Não houve diferença estatística entre a atividade dos venenos para a cepa testada.

O teste de microdiluição foi realizado com a cepa *Staphylococcus aureus* 25923 e os venenos Cdr68 ou Cdr69 foram testados nas concentrações 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ e apresentaram diferença, sendo que o veneno amarelo Cdr69 demonstrou um maior potencial de inibição ($p \leq 0,05$). No entanto na concentração de 0,12 $\mu\text{g/mL}$ o veneno amarelo 68 apresentou maior potencial de inibição ($p \leq 0,05$), conforme a Figura 6.

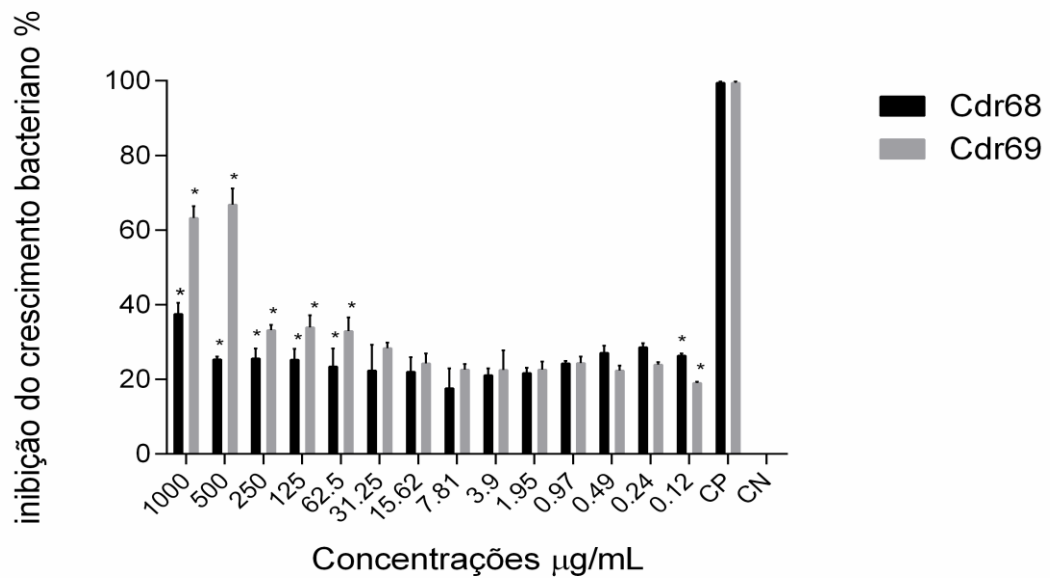


Figura 6. Percentual de Inibição do crescimento bacteriano dos Cdr68 e Cdr69 frente à cepa *Staphylococcus aureus* 25923. Nas concentrações 1000, 500, 250, 125 e 62,5 $\mu\text{g/mL}$ o veneno amarelo Cdr69 demonstrou um maior potencial de inibição ($p \leq 0,05$). CP- Oxitetraciclina controle positivo. CN – Meio de cultura Muller Hinton controle Negativo.

4. Discussão

As características particulares de cada tipo de câncer, os mecanismos de resistência e o amplo espectro de efeitos colaterais fazem com que a prevenção e o tratamento sejam um desafio (Vendramini-Costa et al., 2016).

Nas últimas três décadas foram realizados inúmeros estudos para pesquisar propriedades anticâncer em venenos, o que levou a descoberta de várias moléculas com atividades promissoras, algumas das quais estão em ensaios clínicos e podem se tornar drogas utilizadas na terapia do câncer futuramente (Gomes et al., 2010).

O presente estudo avaliou a atividade citotóxica dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69 e dos brancos Cdr110 e Cdr173 que foram caracterizados anteriormente (Dos-Santos et al., 2005). Os resultados obtidos, no presente estudo, mostraram que os venenos brancos e o veneno de *Crotalus durissus terrificus* não foram citotóxicos, nas concentrações e nas linhagens celulares testadas. No entanto, os venenos amarelos apresentaram atividade para linhagens de tumores de Melanoma (SK-Mel-103), Adenocarcinoma de mama (MCF-7) e Carcinoma colorretal (HCT-116), sendo que esta última apresentou maior sensibilidade a esses venenos. Embora os venenos tenham sido citotóxicos para a linhagem não tumoral de MRC-5, em baixas concentrações os venenos amarelos apresentaram alto potencial citotóxico apenas contra células Carcinoma colorretal.

Estudos realizados com venenos de serpentes das famílias Elapidae, Crotalidae e Viperidae demonstraram que estes causam lise em células de sarcoma de Yoshida (Bragança et al., 1967). Venenos de *Bothrops jararaca* e *Crotalus durissus terrificus*, pertencentes à família Viperidae, atuam diretamente sobre as células tumorais e esta atividade, pode ser devida a resposta inflamatória mediada pela citocina TNF- α e quimiocina CXCL-8 (Da Silva et al., 1996).

Da Silva et al. (1997) avaliou, in vivo, o efeito do veneno de *Crotalus durissus terrificus* na evolução do tumor de Ehrlich. Apesar do tratamento com o veneno não eliminar completamente as células tumorais, houve um aumento no tempo de sobrevivência dos animais e importante estimulação dos macrófagos. Os autores sugerem também que o efeito se deve a ativação de reação inflamatória.

O ensaio do cometa em pH alcalino detecta todos os possíveis tipos de danos ao DNA, enquanto a versão em pH neutro detecta principalmente quebra de fita dupla (Olive, 1999).

O cometa alcalino realizado com células MRC-5 tratadas com Cdr68 e Cdr69, demonstrou que os venenos causam menos dano ao DNA quando comparados com a doxorrubicina. No ensaio do cometa neutro, não houve diferença estatística significativa, entre Cdr68 e doxorrubicina, demonstrando que esses venenos causam danos ao DNA por quebra de fitas duplas, sendo que o Cdr69 foi menos tóxico.

Quando analisamos o cometa alcalino e neutro em Carcinoma colorretal (HCT-116), observamos que Cdr68 e Cdr69, apresentaram ID superiores ao do controle positivo, com diferença estatística significativa, inclusive com danos de classe 4, evidenciando que os venenos causam dano ao DNA, e ainda, quebra de cadeia dupla em células dessa linhagem tumoral. Rupturas de cadeia dupla no DNA são ameaças importantes para a integridade do genoma porque podem resultar em aberrações cromossômicas que afetam, simultaneamente, muitos genes, levando ao mau funcionamento das células e conseqüentemente à morte celular (Van Gent et al., 2001). Estes resultados sugerem que a citotoxicidade dos venenos para essa linhagem tumoral está relacionada com danos ao DNA. No entanto, são necessários mais estudos a respeito do mecanismo de morte causado por esses venenos.

Marcussi et al. (2011) avaliou o potencial genotóxico do veneno de *Crotalus durissus terrificus* e suas toxinas isoladas em linfócitos humanos. No teste do cometa, todas as toxinas testadas (crotamina, crotoxina, fosfolipase A₂ e crotapotina) e o veneno bruto apresentaram

atividade genotóxica, sendo que as toxinas isoladas mostraram maior genotoxicidade em relação ao veneno . Os mesmos autores avaliaram o potencial genotóxico de venenos das serpentes *Bothrops jararacussu*, *B. atrox*, *B. moojeni*, *B. alternatus* e *B. brazili* em linfócitos humanos. Os venenos brutos de *B. brazili*, *B. jararacussu* e *B. atrox* apresentaram potencial genotóxico e os dois últimos induziram quebra de DNA cinco vezes mais do que quando comparados ao controle negativo (Marcussi et al., 2013).

Tamietti et al. (2007) relatou alterações estruturais de filamentos de actina, retículo endoplasmático e núcleo por ação do veneno de *Crotalus durissus terrificus* sobre linhagem de células tumorais de carcinoma ovariano de hamster CHO-K1. Essas mudanças estruturais assim como a fragmentação do DNA observada, sugere que o veneno é capaz de induzir apoptose.

Soares et al. (2010) observaram alterações morfológicas em células de glioblastoma (RT2) e adenoma benigno de pituitária (GH3) tratadas com veneno bruto de *Crotalus durissus terrificus* ou com a crotoxina isolada. Irregularidades na forma celular, encolhimento celular foram observadas no tratamento com veneno bruto. As células tratadas com crotoxina apresentaram encolhimento, irregularidade na forma, condensação nuclear e formação de corpos apoptóticos, todas essas alterações são características de apoptose. Células de carcinoma ovariano OVCAR – 8 tratadas com o veneno *Crotalus durissus cascavella*, apresentaram redução do volume celular, irregularidade da forma, fragmentação nuclear, núcleo picnótico, e formação de corpos apoptóticos. A ativação de caspases 3 e 7 nestas células confirmaram que o veneno induz morte celular por apoptose (Araújo et al., 2016).

As células de Carcinoma colorretal (HCT-116) tratadas com os venenos Cdr68 e Cdr69 apresentaram alterações morfológicas como encolhimento das células, núcleo picnótico, cromatina condensada, vacuolização do citoplasma e em alguns casos foi possível observar restos celulares, demonstrando a destruição das células, sinais que indicam processo

de apoptose, no entanto, estes são os primeiros dados sobre a morfologia de células tratadas com venenos amarelos de *Crotalus durissus ruruima* sendo, portanto, necessários testes específicos para esclarecer o mecanismo de morte induzido por estes venenos.

Como mencionado, os venenos de serpentes são constituídos por uma mistura de substâncias biologicamente ativas, cada componente bioativo pode exercer sua atividade separadamente ou somente quando em conjunto, apresentando efeitos sinérgicos (Lipps, 1995; Rangel-Santos et al., 2004). Portanto, o uso de venenos para tratamento de tumores não é tão simples e pode ser perigoso, uma vez que os venenos são misturas complexas de proteínas e peptídeos que podem afetar a homeostase (Lu et al., 2005), porém o uso de nanopartículas se mostra como uma grande promessa no tratamento de pacientes com câncer. Nanopartículas ligadas a agentes anticâncer podem aumentar as concentrações de drogas em tecidos alvo específicos, podendo ser endocitadas e/ou fagocitadas o que resulta na internalização das drogas, melhorando o índice terapêutico e aumentando sua eficácia e reduzindo sua toxicidade (Barratt, 2003).

Badr et al. (2014) avaliaram o efeito do veneno de *Walterinnesia aegyptia*, sozinho e acoplado a nanopartículas, em células de câncer de mama humano isoladas de biópsias. Ambos inibiram a proliferação, alteraram o ciclo celular e induziram apoptose, além disso, a combinação de veneno com nanopartículas aumentou o efeito antitumoral, os valores CI_{50} para o veneno e para o veneno incorporado a nanopartícula foram de 50 ng/mL e 20 ng/mL respectivamente, indicando o potencial terapêutico de venenos acoplados a nanopartículas no tratamento do câncer.

Neste trabalho os venenos Cdr173, Cdr110, Cdr68, Cdr69 e Cdt, foram avaliados, ainda, quanto à sua atividade antimicrobiana. As amostras Cdr173, Cdr110 e Cdt não foram ativos contra as cepas testadas. Cdr69 e Cdr68 apresentaram atividade contra a cepa de

Staphylococcus aureus 25923. Quando comparados, o Cdr69 apresentou atividade antimicrobiana superior ao Cdr68 ($p \leq 0,05$).

Os primeiros relatos sobre a atividade antibacteriana em venenos de serpente foram feitos em 1948 e em 1968, envolvendo serpentes das famílias Elapidae e Viperidae (Glaser, 1948; Aloof-Hirsch et al., 1968). Os venenos de *Naja* spp. e *Hemachatus haemachatus* foram capazes de romper as membranas fosfolipídicas de *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli*, respectivamente (Aloof-Hirsch et al., 1968).

Várias proteínas foram isoladas dos venenos crotálicos como Crotoxina, L-aminoácido oxidase, Crotamina, dentre outras e suas atividades antimicrobianas foram avaliadas e confirmadas (Oliveira et al., 2003; Toyama et al., 2006; Oguiura et al., 2011)

Diante do exposto, o estudo de venenos de serpentes, encontradas na região Norte do Brasil, se faz necessário para que possamos compreender melhor suas ações frente às células tumorais ou bactérias resistentes a antibióticos. Pesquisadores do nosso grupo, já estão trabalhando no fracionamento e isolamento de proteínas dos venenos, variedades amarela e branca, da serpente Amazônica *Crotalus durissus ruruima*, e realizando os testes de citotoxicidade e de atividade antibacteriana com essas frações isoladas.

Agradecimentos

Ao CNPq pela concessão da Bolsa de Produtividade a Maria Cristina dos Santos (303032/2016-2). À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas pela concessão da Bolsa de Doutorado a Ilia Gilmara Carvalho dos Santos. À FAPEMIG pela concessão de Bolsa de Incentivo à Pesquisa e ao Desenvolvimento Tecnológico a Consuelo Latorre Fortes-Dias.

Referências

- Ahmed, S. A., Gogal, R. M., Walsh, J. E., 1994. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. *Journal of immunological methods* 170: 211-224.
- Aloof-Hirsch, S., De Vries, A., Berger, A., 1968. The direct lytic factor of cobra venom: purification and chemical characterization. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Protein Structure* 154: 53-60.
- Araújo, L. S., Rocha, D. D., Viana, D. A., Silveira, J. a. M., Vasconcelos-Filho, F. S. L., Wilke, D. V., Borges-Nojosa, D. M., O' Pessoa, C., Moraes, M. O., Evangelista, J. S. a. M., 2016. *Crotalus durissus cascavella* VENOM TOXICITY TO MAMMALIAN CELLS. *Veterinária e Zootecnia* 23: 465-475.
- Badr, G., Sayed, D., Maximous, D., Mohamed, A. O., Gul, M., 2014. Increased Susceptibility to Apoptosis and Growth Arrest of Human Breast Cancer Cells Treated by a Snake Venom-Loaded Silica Nanoparticles. *Cellular Physiology and Biochemistry* 34: 1640-1651.
- Barratt, G., 2003. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. *Cellular and Molecular Life Sciences CMLS* 60: 21-37.
- Barros, G. a. C., Pereira, A. V., Barros, L. C., Jr, A. L., Calvi, S. A., Santos, L. D., Barraviera, B., Ferreira, R. S., 2015. In vitro activity of phospholipase A2 and of peptides from *Crotalus durissus terrificus* venom against amastigote and promastigote forms of *Leishmania (L.) infantum chagasi*. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 21: 1-9.
- Barros, L., Soares, A., Costa, F., Rodrigues, V., Fuly, A., Giglio, J., Gallacci, M., Thomazini-Santos, I., Barraviera, S., Barraviera, B., Ferreira Junior, R., 2011. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 17: 23-33.
- Bauer, A. W., Kirby, W. M., Sherris, J. C., Turck, M., 1966. Antibiotic susceptibility testing by a standardized single disk method. *Am. J. Clin. Pathol.* 45: 493-496.
- Benli, M., Yigit, N., 2008. Antibacterial activity of venom from funnel web spider *Agelena labyrinthica* (Araneae: Agelenidae). *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 14: 641-650.
- Bragança, B. M., Patel, N. T., Badrinath, P. G., 1967. Isolation and properties of a cobravenom factor selectively cytotoxic to yoshida sarcoma cells. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - General Subjects* 136: 508-520.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, 2003. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West. Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Clinical and Laboratory Standards Institute, C., 2012. *Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically. Approved Standard—Sixth Edition*. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West. Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA.
- Conde, R., Zamudio, F. Z., Rodríguez, M. H., Possani, L. D., 2000. Scorpine, an anti-malaria and anti-bacterial agent purified from scorpion venom. *FEBS Letters* 471: 165-168.
- Corin, R. E., Viskatis, L. J., Vidal, J. C., Etcheverry, M. A., 1993. Cytotoxicity of crotoxin on murine erythroleukemia cells in vitro. *Investigational New Drugs* 11: 11-15.
- Da Silva, R. J., Fecchio, D., Barravieira, B., 1996. ANTITUMOR EFFECT OF SNAKE VENOMS. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 2: 79-90.

- Da Silva, R. J., Fecchio, D., Barravieira, B., 1997. EFFECT OF *Crotalus durissus terrificus* (LAURENTI, 1768) VENOM ON THE EVOLUTION OF EHRLICH ASCITES TUMOR. *Journal of Venomous Animals and Toxins* 3: 324-341.
- Diz Filho, E. B. S., Marangoni, S., Toyama, D. O., Fagundes, F. H. R., Oliveira, S. C. B., Fonseca, F. V., Calgarotto, A. K., Joazeiro, P. P., Toyama, M. H., 2009. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 53: 104-114.
- Dos-Santos, M. C., Assis, E. B., Moreira, T. D., Pinheiro, J., Fortes-Dias, C. L., 2005. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. *Toxicon* 46: 958-961.
- Dos-Santos, M. C., Ferreira, L. C. L., Da Silva, W. D., Furtado, M. D. F. D., 1993. Caracterizacion de las actividades biologicas de los venenos ‘amarillo’ y ‘blanco’ de *Crotalus durissus ruruima* comparados con el veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Poder neutralizante de los antivenenos frente a los venenos de *Crotalus durissus ruruima*. *Toxicon* 31: 1459-1469.
- Eloff, J. N., 1998. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. *Planta Med* 64: 711-713.
- Foster, T. J., 2004. The *Staphylococcus aureus* “superbug”. *Journal of Clinical Investigation* 114: 1693-1696.
- Glaser, H. S. R., 1948. Bactericidal Activity of *Crotalus* Venom in Vitro. *Copeia* 1948: 245-247.
- Gomes, A., Bhattacharjee, R. M., Biswas, A. K., Dasgupta, S. C., Giri, B., 2010. Anticancer potential of animal venoms and toxins. *Indian Journal of Experimental Biology* 48: 93-103.
- Han, R., Liang, H., Qin, Z., Liu, C., 2014. Crotoxin induces apoptosis and autophagy in human lung carcinoma cells in vitro via activation of the p38 MAPK signaling pathway. *Acta Pharmacologica Sinica* 35: 1323-1332.
- Hegazi, A. G., El-Feel, M., Abdel-Rahman, E., Al-Fattah, A., 2015. Antibacterial activity of bee venom collected from *apis mellifera carniolan* pure and hybrid races by two collection methods. *Int. J. Curr. Microbiol. App. Sci* 4: 141-149.
- Jalaei, J., Fazeli, M., Rajaian, H., Shekarfroush, S. S., 2014. In vitro antibacterial effect of wasp (*Vespa orientalis*) venom. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 20: 22.
- Koh, D. C., Armugan, A., Jeyaseelan, K., 2006. Snake venom components and their applications in biomedicine. *Cellular and Molecular Life Sciences* 63: 3030-3041.
- Kumar, S., Sarkar, P., Jain, R., 2013. Venoms can be a boon for cancer patients. *Forum on Immunopathological diseases and Therapeutics* 4: 255-273.
- Lipps, B. V., 1995. Eleventh World Congress on animal, plant and microbial toxins Tel Aviv, Israel 2–7 October 1994 Abstract of presentations lectures. *Toxicon* 33: 262.
- Lowy, F. D., 1998. *Staphylococcus aureus* infections. *New England journal of medicine* 339: 520-532.
- Lu, Q., Clemetson, J. M., Clemetson, K. J., 2005. Snake venoms and hemostasis. *Journal of Thrombosis and Haemostasis* 3: 1791-1799.
- Maluf, S. C., Mas, C. D., Oliveira, E. B., Melo, P. M., Carmona, A. K., Gazarini, M. L., Hayashi, M. a. F., 2016. Inhibition of malaria parasite *Plasmodium falciparum* development by crotamine, a cell penetrating peptide from the snake venom. *Peptides* 78: 11-16.
- Marcussi, S., Santos, P. R. S., Menaldo, D. L., Silveira, L. B., Santos-Filho, N. A., Mazzi, M. V., Da Silva, S. L., Stábeli, R. G., Antunes, L. M. G., Soares, A. M., 2011. Evaluation of the genotoxicity of *Crotalus durissus terrificus* snake venom and its isolated toxins

- on human lymphocytes. *Mutation Research/Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 724: 59-63.
- Marcussi, S., Stábeli, R. G., Santos-Filho, N. A., Menaldo, D. L., Silva Pereira, L. L., Zuliani, J. P., Calderon, L. A., Da Silva, S. L., Greggi Antunes, L. M., Soares, A. M., 2013. Genotoxic effect of Bothrops snake venoms and isolated toxins on human lymphocyte DNA. *Toxicon* 65: 9-14.
- Mittermeier, R. A., Fonseca, G. D., Rylands, A. B., Brandon, K., 2005. Uma breve história da conservação da biodiversidade no Brasil. *Megadiversidade* 1: 14-21.
- Muller, V. D. M., Russo, R. R., Oliveira Cintra, A. C., Sartim, M. A., De Melo Alves-Paiva, R., Figueiredo, L. T. M., Sampaio, S. V., Aquino, V. H., 2012. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. *Toxicon* 59: 507-515.
- Neves, M. S., Sousa, D. R. T., Socorro, M. P., Ferreira, B. C., Frota, M. Z. M., Souza, J. V. B., Lozano, L. L. L., 2015. Evaluation of antifungal activity of snake venoms from the Amazon forest. *Journal of Yeast and Fungal Research* 6: 11-16.
- Oguiura, N., Boni-Mitake, M., Affonso, R., Zhang, G., 2011. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. *The Journal of Antibiotics* 64: 327-331.
- Olive, P. L., 1999. DNA damage and repair in individual cells: applications of the comet assay in radiobiology. *International Journal of Radiation Biology* 75: 395-405.
- Oliveira, D. G., Toyama, M. H., Martins, A. M. C., Havt, A., Nobre, A. C. L., Marangoni, S., Câmara, P. R., Antunes, E., De Nucci, G., Beliam, L. O. S., Fonteles, M. C., Monteiro, H. S. A., 2003. Structural and biological characterization of a crotoxin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 42: 53-62.
- Perumal Samy, R., Pachiappan, A., Gopalakrishnakone, P., Thwin, M. M., Hian, Y. E., Chow, V. T., Bow, H., Weng, J. T., 2006. In vitro antimicrobial activity of natural toxins and animal venoms tested against *Burkholderia pseudomallei*. *BMC Infectious Diseases* 6: 100.
- Perumal Samy, R., Stiles, B. G., Franco, O. L., Sethi, G., Lim, L. H. K., 2017. Animal venoms as antimicrobial agents. *Biochem Pharmacol* 134: 127-138.
- Quintana, J. C., Chacón, A. M., Vargas, L., Segura, C., Gutiérrez, J. M., Alarcón, J. C., 2012. Antiplasmodial effect of the venom of *Crotalus durissus cumanensis*, crotoxin complex and Crotoxin B. *Acta Tropica* 124: 126-132.
- Rangel-Santos, A., Dos-Santos, E. C., Lopes-Ferreira, M., Lima, C., Cardoso, D. F., Mota, I., 2004. A comparative study of biological activities of crotoxin and CB fraction of venoms from *Crotalus durissus terrificus*, *Crotalus durissus cascavella* and *Crotalus durissus collilineatus*. *Toxicon* 43: 801-810.
- Rudd, C. J., Viskatis, L. J., Vidal, J. C., Etcheverry, M. A., 1994. In vitro comparison of cytotoxic effects of crotoxin against three human tumors and a normal human epidermal keratinocyte cell line. *Investigational New Drugs* 12: 183-184.
- Santos, N. Q., 2004. A resistência bacteriana no contexto da infecção hospitalar. *Texto Contexto Enferm* 13: 64-70.
- Singh, N. P., McCoy, M. T., Tice, R. R., Schneider, E. L., 1988. A simple technique for quantitation of low levels of DNA damage in individual cells. *Experimental Cell Research* 175: 184-191.
- Soares, M., Pujatti, P., Fortes-Dias, C., Antonelli, L., Santos, R., 2010. *Crotalus durissus terrificus* venom as a source of antitumoral agents. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 16: 480-492.
- Tamietti, B. P., Damatta, R. A., Cogo, J. C., Da Silva, N. S., Mittmann, J., Pacheco-Soares, C., 2007. Cytoskeleton, endoplasmic reticulum and nucleus alterations in CHO-K1 cell

- line after *Crotalus durissus terrificus* (South American rattlesnake) venom treatment. *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases* 13: 56-68.
- Toyama, M. H., Toyama, D. D. O., Passero, L. F. D., Laurenti, M. D., Corbett, C. E., Tomokane, T. Y., Fonseca, F. V., Antunes, E., Joazeiro, P. P., Beriam, L. O. S., Martins, M. a. C., Monteiro, H. S. A., Fonteles, M. C., 2006. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. *Toxicon* 47: 47-57.
- Van Gent, D. C., Hoeijmakers, J. H., Kanaar, R., 2001. Chromosomal stability and the DNA double-stranded break connection. *Nat Rev Genet* 2: 196-206.
- Vargas, L. J., Quintana, J. C., Pereañez, J. A., Núñez, V., Sanz, L., Calvete, J., 2013. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. *Toxicon* 64: 1-11.
- Vendramini-Costa, D. B., Alcaide, A., Pelizzaro-Rocha, K. J., Talero, E., Ávila-Román, J., Garcia-Mauriño, S., Pilli, R. A., De Carvalho, J. E., Motilva, V., 2016. Goniiothalamine prevents the development of chemically induced and spontaneous colitis in rodents and induces apoptosis in the HT-29 human colon tumor cell line. *Toxicology and Applied Pharmacology* 300: 1-12.
- White, J., 2000. Bites and stings from venomous animals: a global overview. *Therapeutic drug monitoring* 22: 65-68.
- Who, 2017. Cancer: <http://www.who.int/cancer/en>. (accessed 07.08.2017).
- Wojewódzka, M., Buraczewska, I., Kruszewski, M., 2002. A modified neutral comet assay: Elimination of lysis at high temperature and validation of the assay with anti-single-stranded DNA antibody. *Mutation Research - Genetic Toxicology and Environmental Mutagenesis* 418: 9-20.

CAPÍTULO III

Citotoxicidade e atividade antibacteriana de frações isoladas do veneno amarelo de *Crotalus durissus ruruima*

Capítulo escrito de acordo com normas da ABNT, o qual deverá ser submetido para publicação após a avaliação dos membros da banca.

1. Introdução

A peçonha de *Crotalus durissus terrificus*, a cascavel Sul-americana, é a mais estudada dentre as peçonhas desse gênero de serpentes e é composta por aproximadamente 90% de proteínas e peptídeos, apresentando como principais toxinas, a crotoxina, convulxina, giroxina (ou trombina-similes) e, em alguns casos, a crotamina (BIEBER, 1979; MARTINS et al., 2002; TOYAMA et al., 2003).

A crotoxina é a principal neurotoxina e miotoxina do veneno crotálico, com aproximadamente 20 kDa, formada pela associação iônica de duas subunidades, uma básica, a fosfolipase A₂ (Componente B ou Crotoxina B) e a outra ácida, a crotapotina (Componente A ou Crotoxina A) (HENDON; FRAENKEL-CONRAT, 1971). O componente ácido apresenta três cadeias polipeptídicas, com massa total de 8,9 kDa e ponto isoelétrico de 3,4 (BREITHAUPT et al., 1974), o componente básico consiste em uma única cadeia polipeptídica com massa molecular de 14,5 kDa e ponto isoelétrico de 9,7 (FRAENKEL-CONRAT et al., 1980).

As atividades biológicas da crotoxina incluem, principalmente, neurotoxicidade, mas também miotoxicidade, nefrotoxicidade e a cardiotoxicidade. No entanto, estudos apontam outras importantes ações para essa toxina, como: imunomoduladora, anti-inflamatória, antitumoral, antimicrobiana e analgésica (YAN et al., 2006; ZHANG et al., 2006; ZAMBELLI et al., 2008; DIZ FILHO et al., 2009; NUNES et al., 2010).

As fosfolipases A₂ (PLA₂) catalisam a hidrólise de glicerofosfolípidos na posição sn-2, liberando ácidos graxos livres, lisofosfolípidos e ácido araquidônico precursor de prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos, iniciando uma série de reações inflamatórias (ARNI; WARD, 1996). Essas enzimas foram classificadas em cinco categorias: as PLA₂ secretadas (sPLA₂), que requerem Ca²⁺ para suas atividades, as citosólicas (cPLA₂) que são sensíveis aos níveis de Ca²⁺, as independentes de Ca²⁺ (iPLA₂), as acetil-hidrolases fator ativador de plaquetas (PAF-AH) e as lisossomais (JESÚS BALSINDE et al., 1999; BURKE; DENNIS, 2009).

Venenos de serpentes da subfamília Crotalinae (família Viperidae) possuem uma série de fosfolipases A₂ básicas secretadas que têm um papel miotóxico importante. Com base na sua estrutura primária e padrão de pontes dissulfetos, as PLA₂ miotóxicas são classificados no grupo IIA (SIX; DENNIS, 2000). Três tipos diferentes de PLA₂ são reconhecidos em venenos de serpentes: os que possuem ácido aspártico na posição 49 (Asp49); os que possuem uma

lisina na posição 49 (Lys49); e os que têm uma serina na posição 49 (Ser49) (MARAGANORE et al., 1984; POLGÁR et al., 1996; LOMONTE et al., 2003).

As PLA₂ Asp-49 possuem sítio de ligação de cálcio e a substituição do resíduo Asp-49 por Lys-49 altera o sítio, impedindo a ligação do Ca²⁺ o que torna esta PLA₂ inativa cataliticamente (GUTIÉRREZ; LOMONTE, 2013). Porém, estas enzimas exibem uma grande variabilidade de efeitos farmacológicos por mecanismos que podem ser independentes ou dependentes de sua atividade enzimática, como, miotoxicidade, ação anticoagulante, neurotoxicidade, cardiotoxicidade, antibacteriana e antitumoral (KINI; EVANS, 1989; LOMONTE et al., 2003; NÚÑEZ et al., 2004; RODRIGUES et al., 2009; TORRES et al., 2010). Atualmente estudos por cristalografia sugerem que a conformação e o arranjo de monômeros da molécula estão relacionados com o mecanismo de dano muscular exercido pelas da PLA₂ (SALVADOR et al., 2017).

Em estudo prévio de caracterização individual, realizado com os venenos do presente estudo (amarelos Cdr68 e 69; brancos 110 e 173) a atividade PLA₂ foi menor nos venenos brancos, com a seguinte ordem de atividade crescente 68>69>173>110. O Cdr68 foi o que apresentou menor dose mínima coagulante tanto em plasma, como em fibrinogênio. Em relação à miotoxicidade, foram observados vários graus, sendo o Cdr110 o mais miotóxico, seguido de Cdr69, 68 e 173 (DOS-SANTOS et al., 2005). No capítulo anterior, os venenos amarelos Cdr68 e Cdr69 brutos de *Crotalus durissus ruruima* apresentaram atividade citotóxica frente à linhagem tumoral de Carcinoma colorretal HCT-116, com CI₅₀ de 1,8 µg/mL e 1,3 µg/mL respectivamente, e atividade antibacteriana contra cepa de *Staphylococcus aureus*. Dessa forma, o objetivo deste estudo foi avaliar os perfis proteicos dos venenos amarelos e brancos, além de verificar os potenciais antibacteriano e antitumoral, e as atividades fosfolipásica A₂ e coagulante das frações isoladas dos venenos amarelos *Crotalus durissus ruruima*.

2. Material e Métodos

2.1. Venenos

Os venenos de *Crotalus durissus ruruima* foram obtidos de serpentes adultas procedentes de Boa Vista (RR) e mantidas no Núcleo de Animais Peçonhentos, do Instituto de Medicina Tropical do Amazonas. Para a extração dos venenos as serpentes foram anestesiadas com vapor de gás carbônico, coletados individualmente, separados de acordo com a coloração, filtrados em filtros de 0,45µm, liofilizados e estocados a -20° C. Os venenos

variedades amarelas foram identificados como Cdr68 e 69 e os brancos foi identificado como Cdr110 e Cdr173. O veneno de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) utilizado como referência foi coletado de serpentes da região de Minas Gerais, Brasil.

2.2. Cromatografia de Exclusão Molecular

Os venenos foram dissolvidos em tampão Bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8, até dissolução máxima em banho de gelo, seguido pelo processo de clarificação por centrifugação (13000 rpm por 20 min). Os sobrenadantes obtidos foram coletados e aplicados, individualmente, em coluna de exclusão molecular Superdex 200 10x300 GL (GE HealthCare) acoplada em sistema HPLC (Akta Purifier 10, GE HealthCare), previamente equilibrada com o mesmo tampão utilizado para a diluição dos venenos. Cada aplicação continha aproximadamente 1,3mg de veneno em 200 μ L de tampão e o número de corridas foi de acordo com a disponibilidade do veneno. As frações foram obtidas em fluxo constante de 0,5 mL/min e coletadas em intervalos constantes de 1 min para cada tubo. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm e as frações coletadas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C para posterior utilização.

Para estimativa de massa molecular média das frações, foi feita a calibração prévia da coluna, sob as mesmas condições, com proteínas de massa molecular conhecida: RNase (13,7 kDa), soroalbumina bovina (67 kDa), catalase (232 kDa) e ferritina (440 kDa). O volume de eluição (V_e) do pico máximo de cada proteína foi dividido pelo volume total da coluna ($V_t=23,6$ mL) e a razão foi plotada contra o log das respectivas massas moleculares (curva padrão). Em seguida, foi calculada a razão V_e/V_t das amostras e as massas médias das proteínas contidas nos picos foram estimadas a partir da curva padrão.

2.3. Cromatografia de Fase Reversa

O pico de interesse da exclusão molecular foi submetido à cromatografia de Fase Reversa, usando coluna analítica Small Pore Vydac C-18 201SP54 (Grace Vydac, CA, USA). O pico foi dissolvido em 2 mL de solução aquosa de TFA 0,1% em água e a coluna foi equilibrada, previamente, com o mesmo solvente. A eluição foi feita com gradiente linear de 20% a 100% de TFA 0,1% em acetonitrila, com 48 volumes de coluna. O monitoramento da corrida cromatográfica foi realizado a 280 nm e as frações obtidas foram liofilizadas e armazenadas a -20°C. O software utilizado para as análises dos cromatogramas foi o UNICORN (GE HealthCare).

2.4. Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS – PAGE)

A eletroforese foi feita em Phastgel® (Phast System, GE HealthCare) com gradiente 8-25%, na presença de SDS (SDS strips), segundo o protocolo do fabricante. Para estimativa de massa molecular média das bandas proteicas das amostras no gel, foi aplicado um padrão de proteínas de massas moleculares conhecidas e traçada uma curva padrão a partir da distância de migração no gel (Rf). A partir do Rf das bandas da amostra, foram estimadas as massas moleculares correspondentes.

2.5. Atividade Fosfolipásica A₂

A atividade fosfolipase A₂ (PLA₂) foi mensurada pela ação hidrolítica sobre gema de ovo incorporada a ágar, na presença de ions cálcio, de acordo com HABERMANN; HARDT (1972). A atividade foi expressa pelo diâmetro do halo de hidrólise, em milímetros.

2.6. Atividade Coagulante sobre plasma e sobre fibrinogênio

A atividade coagulante foi realizada de acordo com a metodologia descrita por THEAKSTON; REID (1983), com modificações. Duzentos microlitros de plasma (2,8 g/L) ou de fibrinogênio foram previamente incubados a 37°C. Logo após, as amostras de interesse foram adicionadas individualmente e observada presença de atividade coagulante. O tempo necessário para a formação da rede de fibrina na forma de coágulo foi medido em segundos e observado visualmente. A não formação da rede de fibrina depois de decorrido um tempo máximo de 10 minutos foi considerado como ausência de atividade coagulante.

2.7. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue

A avaliação da atividade citotóxica dos venenos foi feita na linhagem tumoral de carcinoma colorretal humano (HCT-116) e na linhagem não tumoral de fibroblastos humanos (MRC-5).

Todas as linhagens celulares foram compradas do Banco de Células do Rio de Janeiro e tiveram as condições de cultivo adaptadas para o Laboratório de Atividade Biológica II (BIOPHAR II), da Universidade Federal do Amazonas (UFAM). As células foram cultivadas em meio DMEM (Gibco®, Life Technologies, EUA) contendo 10% de soro fetal bovino

(FBS) (Gibco®, Life Technologies, EUA), 50 U/mL de penicilina e 50 µg/mL de estreptomicina (Invitrogen) e mantidas a 37°C em estufa a 5% de CO₂.

O ensaio de Alamar Blue foi realizado segundo metodologia descrita por AHMED et al. (1994). As células foram plaqueadas na concentração de 5×10^3 células/ poço em placas de 96 poços. Como controle positivo de morte, foi usada a Doxorubicina (5 µg/mL) (Sigma) e como o controle-negativo foi usado o meio de cultura (diluído das amostras). Após 72 horas de tratamento, 10 µL da solução de Alamar Blue® (Sigma) a 0,4% foi adicionado em cada poço da placa e após 2h de exposição, a fluorescência foi medida em leitor de microplaca (DTX800 Beckman e Coulter).

2.8. Avaliação da atividade antimicrobiana - Teste microdiluição

A atividade antimicrobiana foi testada por microdiluição em caldo (ELOFF, 1998; CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE, 2003). Diluições seriadas das amostras foram feitas (100 a 0.39 µg/mL), e em seguida, 95 µL de cada diluição foram adicionados em cada pocinho da placa. Logo após, a cepa de *Staphylococcus aureus* (5 µL) foi inoculado, a turvação deste micro-organismo teste foi comparada e ajustada à turvação do tubo 0,5 da escala de MacFarland e diluído 10 vezes. As placas foram incubadas a 37°C por 24 horas. Após esse período, as placas foram lidas em espectrofotômetro a 625nm e os valores de crescimento da bactéria foram obtidos e analisados.

2.9. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa por tempo de voo de ionização/ dessorção a laser assistida por matriz foi realizada em um instrumento AutoFlex III MALDI-TOF-TOF (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), controlado pelo software FlexControl 3.0. As amostras foram preparadas diretamente na placa, na qual foram misturados 5 µL de cada amostra com 5 µL da matriz ácido sinapínico e foi aguardada a secagem em temperatura ambiente.

As massas médias foram gravadas em modo linear positivo com calibração externa utilizando o kit *Protein Calibration Standard I* (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha), contendo [M+H]⁺: Insulina 5734,51; Ubiquitina I 8565,76; Citocromo C 12360,97; Mioglobina 16952,30 e [M+2H]²⁺: Citocromo C 6180,99; Mioglobina 8476,65.

Os dados foram adquiridos na faixa de 2.000-16.000 m/z e, quando necessário, em faixas inferiores ou superiores. Para aquisição na faixa 14,000–100,000 m/z, a calibração foi

feita com o kit *Protein Calibration Standard* (Bruker Daltonics, Bremen, Germany), contendo $[M + H]^+$: Trypsinogen 23,982; Protein A: 44,613 and $[M + H]^2+$: Protein A: 22,30. Todos os espectros foram processados utilizando o software Flex Analysis 3.3 (Bruker Daltonics, Bremen, Alemanha).

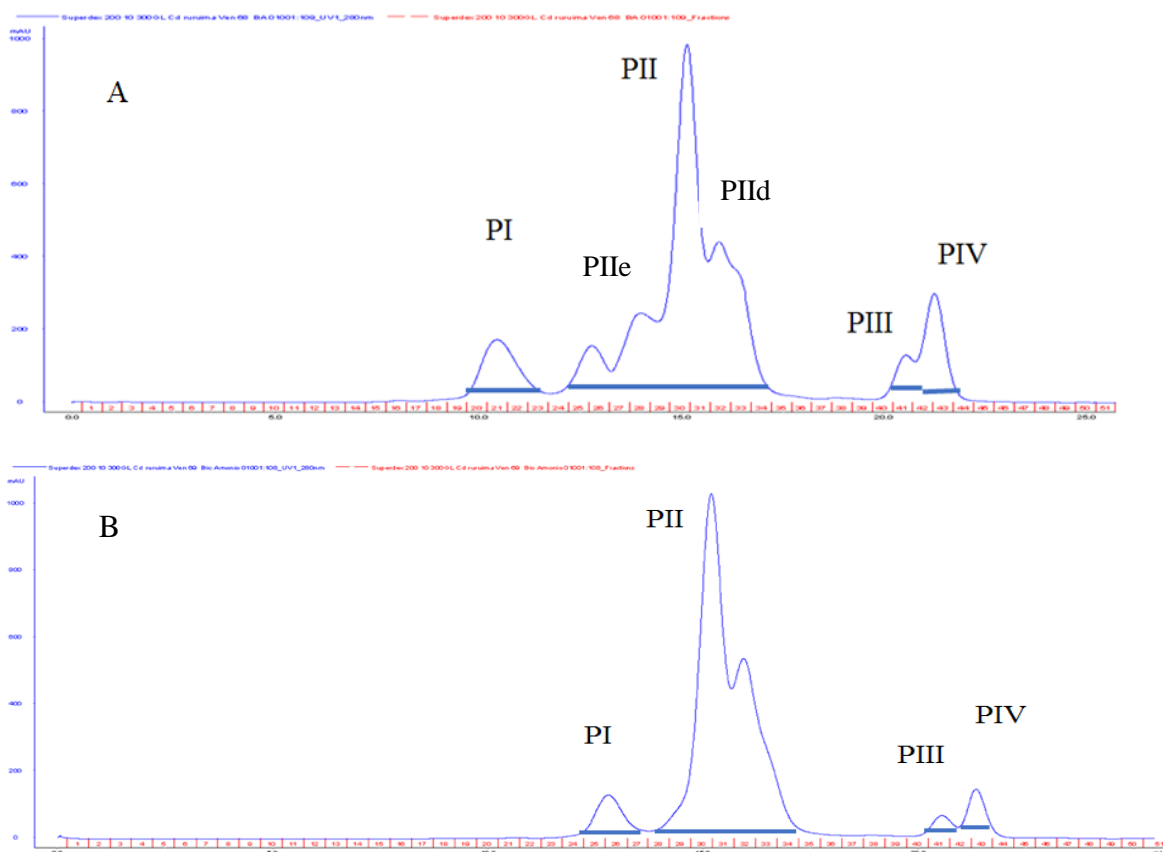
2.10. Análise estatística

Os resultados foram expressos como média \pm desvio padrão. Para comparação das médias foi utilizado Análise de Variância (ANOVA) “One-Way” ou “Two-Way”, seguida do pós-teste de Tukey (para múltiplas comparações). As retas de regressão linear foram calculadas pelo método de mínimos quadrados. O nível de significância adotado foi de $p \leq 0,05$.

3. Resultados

3.1. Etapa 1 - Cromatografia de Exclusão Molecular

Os perfis dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69, brancos Cdr110 e Cdr173, assim como de Cdt, fracionados por cromatografia de exclusão molecular, estão representados na Figura 1, na qual observa-se que todos apresentaram quatro picos principais com diferentes perfis cromatográficos e tempos de retenção.



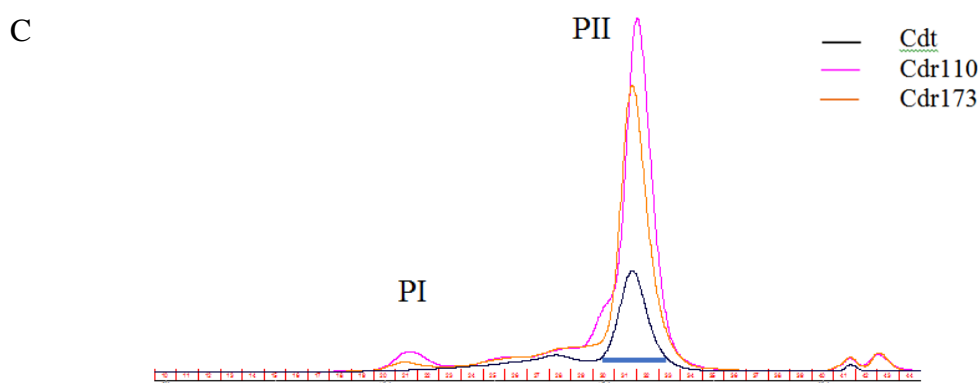


Figura 1. Perfis cromatográficos em exclusão molecular (Superdex 200 10X300 GL) dos venenos Cdr68 (A) e Cdr69 (B) e perfis sobrepostos dos venenos Cdr110, Cdr173 e Cdt (C). Condições: Tampão Bicarbonato de amônio 50 mM, pH 7,8, fluxo 0.5 mL/min, coleta de 0.5 mL/fração. Amostra aplicada: 1,3 mg (peso seco) em 200 μ L.

Ao analisar os cromatogramas observa-se que os venenos brancos de *Crotalus durissus ruruima* têm perfis proteicos mais semelhantes ao de *Crotalus durissus terrificus*, do que dos amarelos de sua própria subespécie, *C. d. ruruima*.

Nos cromatogramas observa-se, ainda, que apenas os venenos amarelos apresentaram um “ombro” no segundo pico.

Para obtenções dos valores de massa molecular e Fase Reversa, as frações obtidas de várias cromatografias foram reunidas e agrupadas conforme os picos de PI a PIV, segundo a ordem de eluição (Fig.1) e, para os ensaios de atividades biológicas, as frações foram liofilizadas e testadas individualmente.

As massas moleculares para as proteínas contidas nos picos da cromatografia de exclusão molecular de Cdr68, 69 e 110 foram estimadas pelo volume médio de eluição nos cromatogramas, de acordo com a curva de calibração da coluna utilizada (Fig. 2).

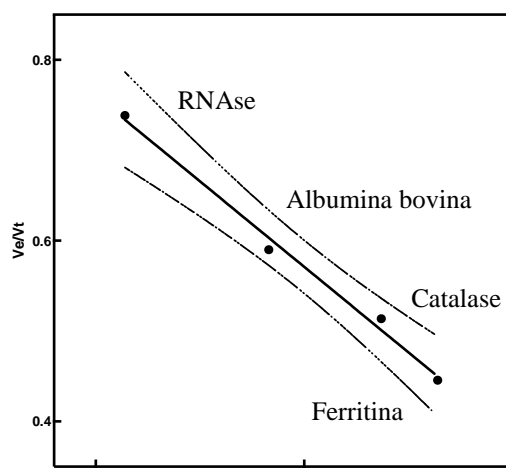


Figura 2. Curva de calibração da coluna cromatográfica de exclusão molecular Superdex 200 com proteínas de massa molecular conhecida (identificadas na curva). Equação da reta de regressão linear $y = -0.1892x + 0.9493$; com coeficiente de correlação (R^2) = 0.9921. As linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança (95%).

As estimativas de massa molecular dos picos cromatográficos estão sumarizadas na Tabela 1.

Tabela 1. Estimativa de massa molecular média (em kDa) das proteínas nos picos da cromatografia de exclusão molecular (Superdex 200) dos venenos de Cdr68, Cdr69 e Cdr 110 que foi incluído como comparação. PIIe e PIIId referem-se aos ombros à esquerda e à direita de PII, quando existentes.

Veneno	Pico I	Pico II			PIII	PIV
		PIIe	PII	PIId		
Cdr 68	324,9	114,7 67,8	40,0	19,8	3,4	2,4
Cdr 69	99,4	-	27,6	21,4	3,7	2,0
Cdr 110	103,6	-	22,9	-	3,7	2,0

3.1.1. Eletroforese em gel de poliacrilamida (SDS-PAGE)

As massas moleculares para as proteínas contidas nos picos da cromatografia de exclusão molecular de Cdr 68 e de 69 foram estimadas pela migração em eletroforese, de acordo com curva padrão de proteínas de massa conhecida (Fig. 3). Esses venenos brutos foram os que apresentaram atividades antimicrobiana e antitumoral descritas no capítulo anterior.

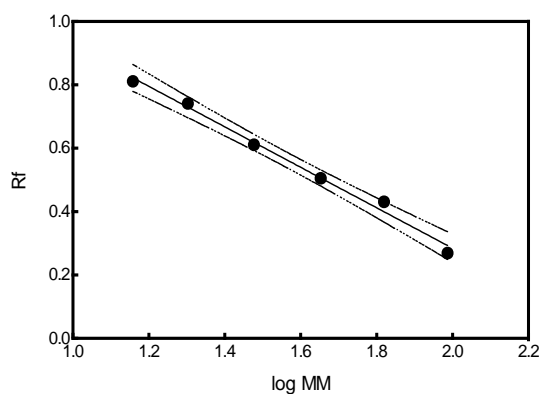


Figura 3. Curva padrão de proteínas pré-coradas em SDS-PAGE, exemplificada para o gel de Cdr69. Equação da reta de regressão linear $y = -0.6395x + 1.5620$; com coeficiente de correlação (R^2) = 0.9908. As linhas pontilhadas representam os intervalos de confiança (95%).

As bandas proteicas contidas nos picos cromatográficos da etapa de fracionamento por exclusão molecular estão mostradas nos géis da Fig. 4.

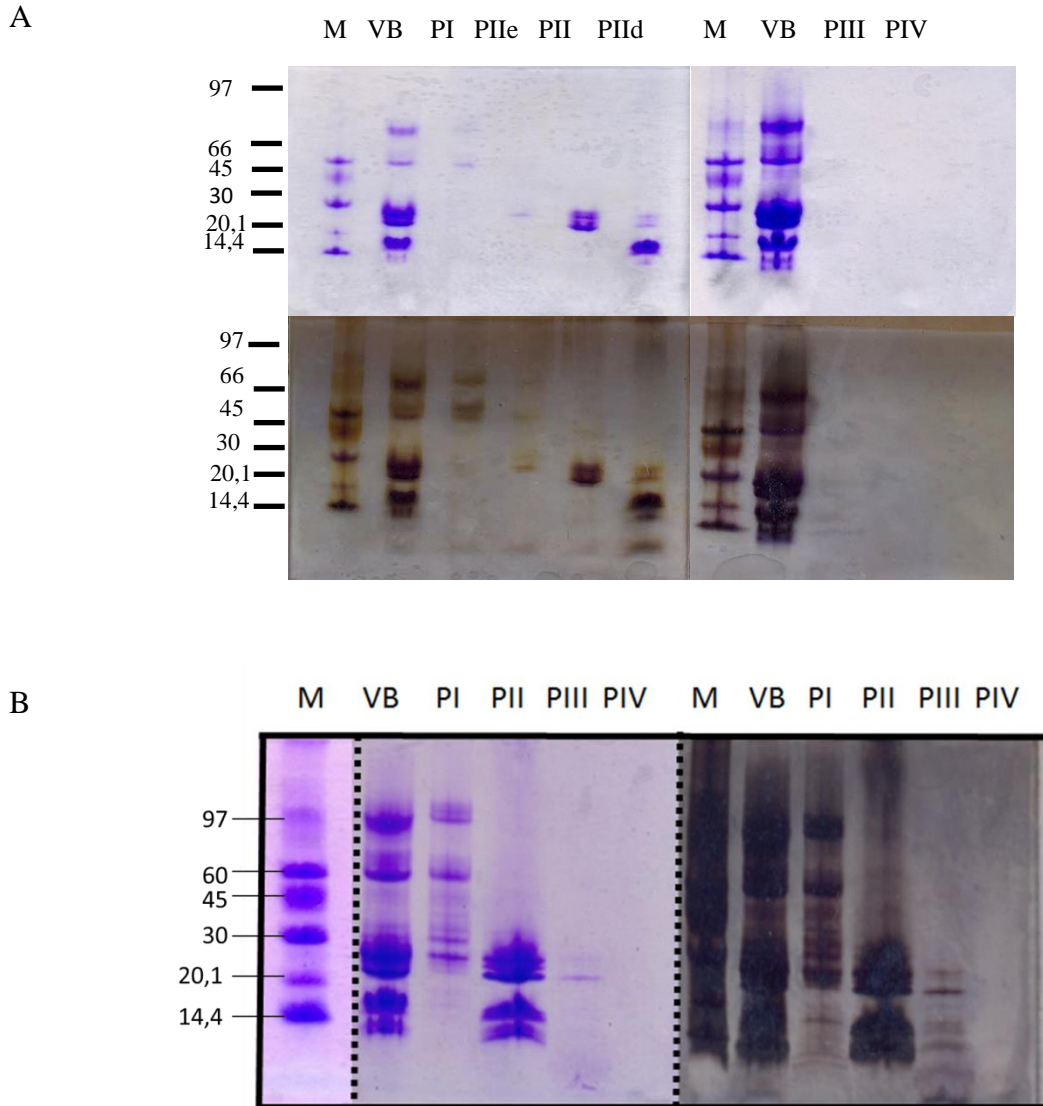


Figura 4. Gel de poliacrilamida com gradiente de 8-25% com strip de SDS, dos picos PI a PIV cromatografia por exclusão molecular em Superdex S200 de Cdr68 (A) e Cdr69 (B), após coloração por azul de Coomassie ou prata. M. Marcador de massa molecular (kDa); VB.Veneno bruto, PIIe e PIIId referem-se aos ombros à esquerda e à direita de PII no perfil cromatográfico de exclusão de Cdr68, que foram amostrados separadamente para o gel.

As massas moleculares das bandas proteicas em eletroforese estão sumarizadas na Tabela 2. Os picos II (PII), tanto de Cdr 68 quanto o de Cdr 69, concentram as bandas proteicas com massas moleculares esperadas para as fosfolipases A₂ (em torno de 14 kDa).

Tabela 2. Estimativa da faixa de massa molecular (kDa) das bandas proteicas em SDS-PAGE, contidas nos picos PI e PII da cromatografia de exclusão molecular dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69

Veneno	Pico I	Pico II		
		PIIe	PII	PIId
Cdr 68	102,3 – 22,9	n.i.	15,8 – 13,6	15,8 – 7,0
Cdr 69	111,7 – 26,0	-	27,1 – 12,5	-

n.i – não identificada

3.1.2. Atividade Fosfolipásica A₂

Todas as frações isoladas de Cdr69 e Cdr110 foram submetidas ao teste de atividade fosfolipásica. Observa-se que no veneno amarelo Cdr69 existe um deslocamento da atividade fosfolipásica para o “ombro” a direita do pico II, enquanto no veneno branco a atividade fosfolipásica A₂ se sobrepõe ao pico II (Fig.5).

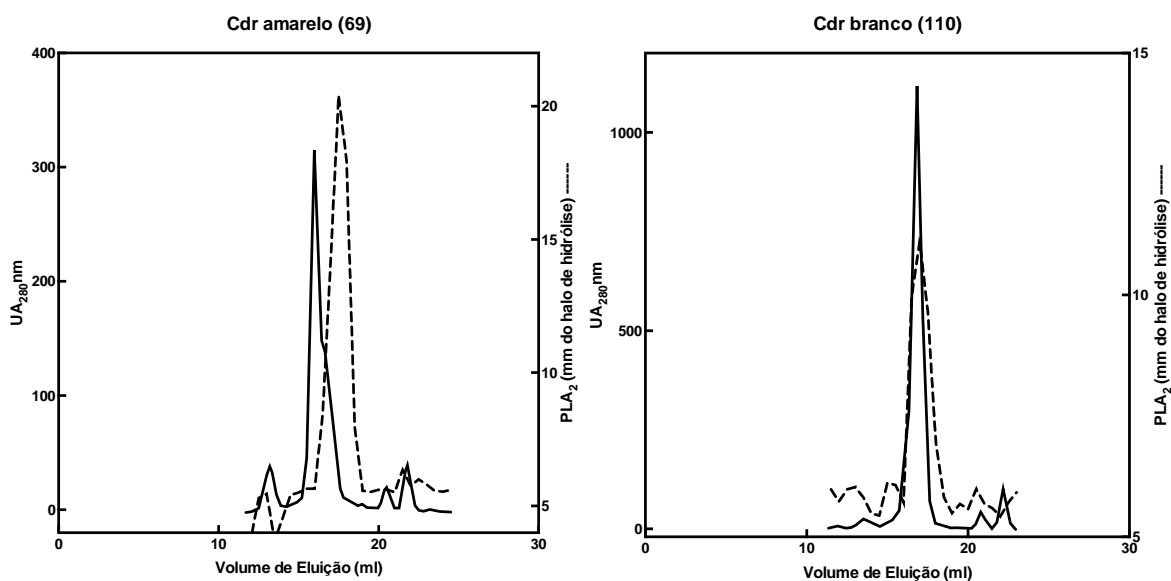


Figura 5. Perfil cromatográfico (linha contínua) e perfis de atividade PLA₂ (linha pontilhada) do veneno amarelo Cdr69 e branco Cdr 110 em gel filtração (Superdex 200 10X300 GL). Tampão Formiato de amônio 100 mM pH 6,5, fluxo 0.5 mL/min, coleta de 0.5 mL/fração. Amostra aplicada: 1,3 mg (peso seco) em 200 µL.

3.1.3. Atividade Coagulante sobre plasma e sobre fibrinogênio.

No teste de coagulação, realizado com todas as frações da Cromatografia de Exclusão Molecular, foi observada atividade coagulante nas frações de 30 a 36 no Cdr68 e nas frações de 31 a 35 no Cdr69 (Fig. 6). O veneno Cdr68 apresentou maior ação coagulante do que o Cdr69 nas frações 31 e 32 ($p \leq 0,05$). Porém, as frações 33 e 34, de ambos os venenos, apresentaram maior atividade coagulante sobre o plasma. Quanto menor o tempo de coagulação, maior a atividade coagulante do veneno testado.

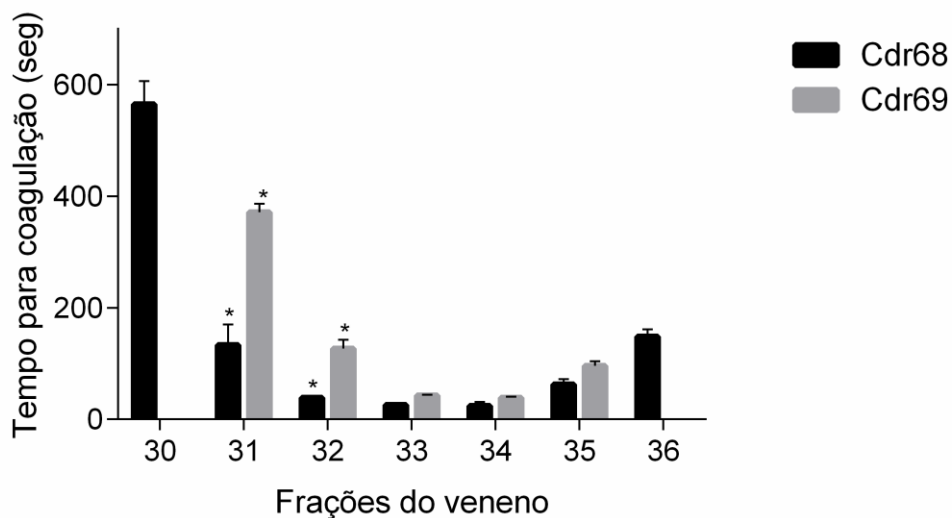


Figura 6. Perfis de atividade coagulante dos venenos Cdr68 e Cdr69 de *Crotalus durissus ruruima* em teste realizado com plasma (2,8 g/L). O Cdr68 apresentou atividade coagulante nas frações de 30 a 36 e o Cdr69 nas frações de 31 a 35.

As frações 33 e 34 de Cdr68 e Cdr69 foram submetidas ao teste de coagulação sobre o fibrinogênio (2g/L) e a atividade “Trombin-like” dessas frações foram confirmadas (Fig. 7). O Cdr68 apresentou maior atividade “Trombin-like” que Cdr69 ($p \leq 0,05$).

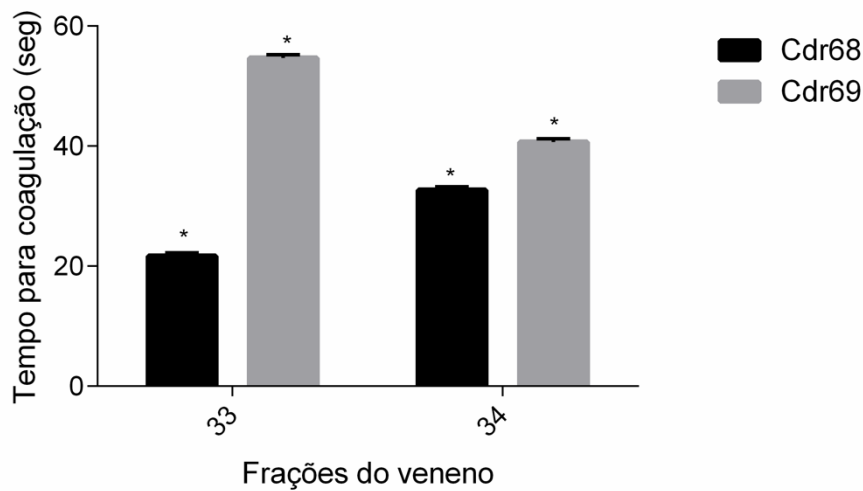


Figura 7. Perfil de atividade coagulante das frações 33 e 34 de Cdr68 e Cdr69 de *Crotalus durissus ruruima* em teste realizado com fibrinogênio (2 g/L). O Cdr68 apresentou maior atividade Trombin-like que o Cdr69 ($p \leq 0,05$).

3.1.4. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue

Todas as frações isoladas da Cromatografia de Exclusão Molecular dos venenos Cdr68 e 69 foram testadas, individualmente, quanto à citotoxicidade para HCT-116 e para MRC-5. Apenas as frações 25 e 26 do Cdr68 e a 25 do Cdr69 foram citotóxicas. Para as demais, a viabilidade celular permaneceu em torno de 90 a 100%. As frações 25 de ambos os venenos foram mais citotóxicas para células HCT-116 do que para MRC-5 ($p \leq 0,05$). Já a fração 26 de Cdr68 foi igualmente citotóxica para as duas linhagens celulares (Fig. 8).

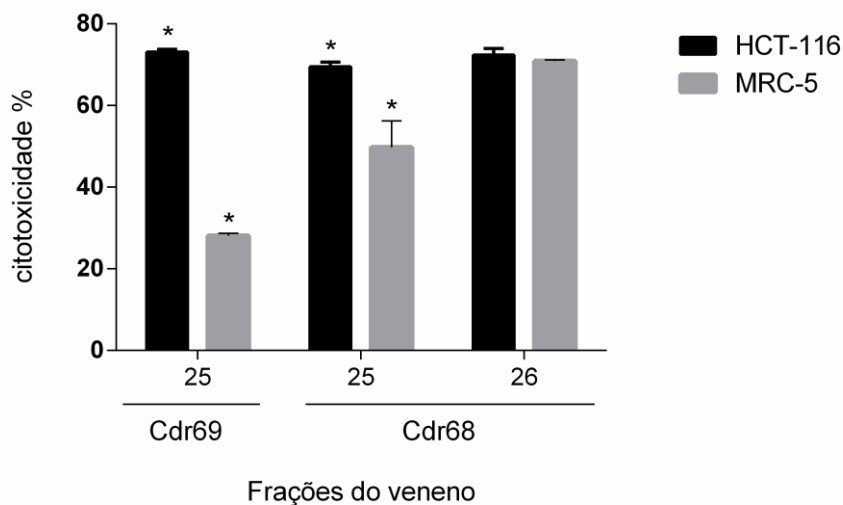


Figura 8. Ensaio de citotoxicidade em células de fibroblasto humano linhagem MRC-5 e carcinoma colorretal linhagem HCT-116 realizado com frações cromatográficas da exclusão molecular do veneno Cdr68 e Cdr69 ($p \leq 0,05$).

3.2. Etapa 2 – Cromatografia de Fase Reversa

Os picos II (PII) da etapa anterior dos cinco venenos (Cdr68, Cdr69, Cdr110, Cdr173 e Cdt) foram aplicados em coluna analítica de Fase Reversa (Fig. 9). Da mesma forma que anteriormente, os picos de proteína foram identificados de acordo com a ordem de eluição no cromatograma (FRP1 a FRP6).

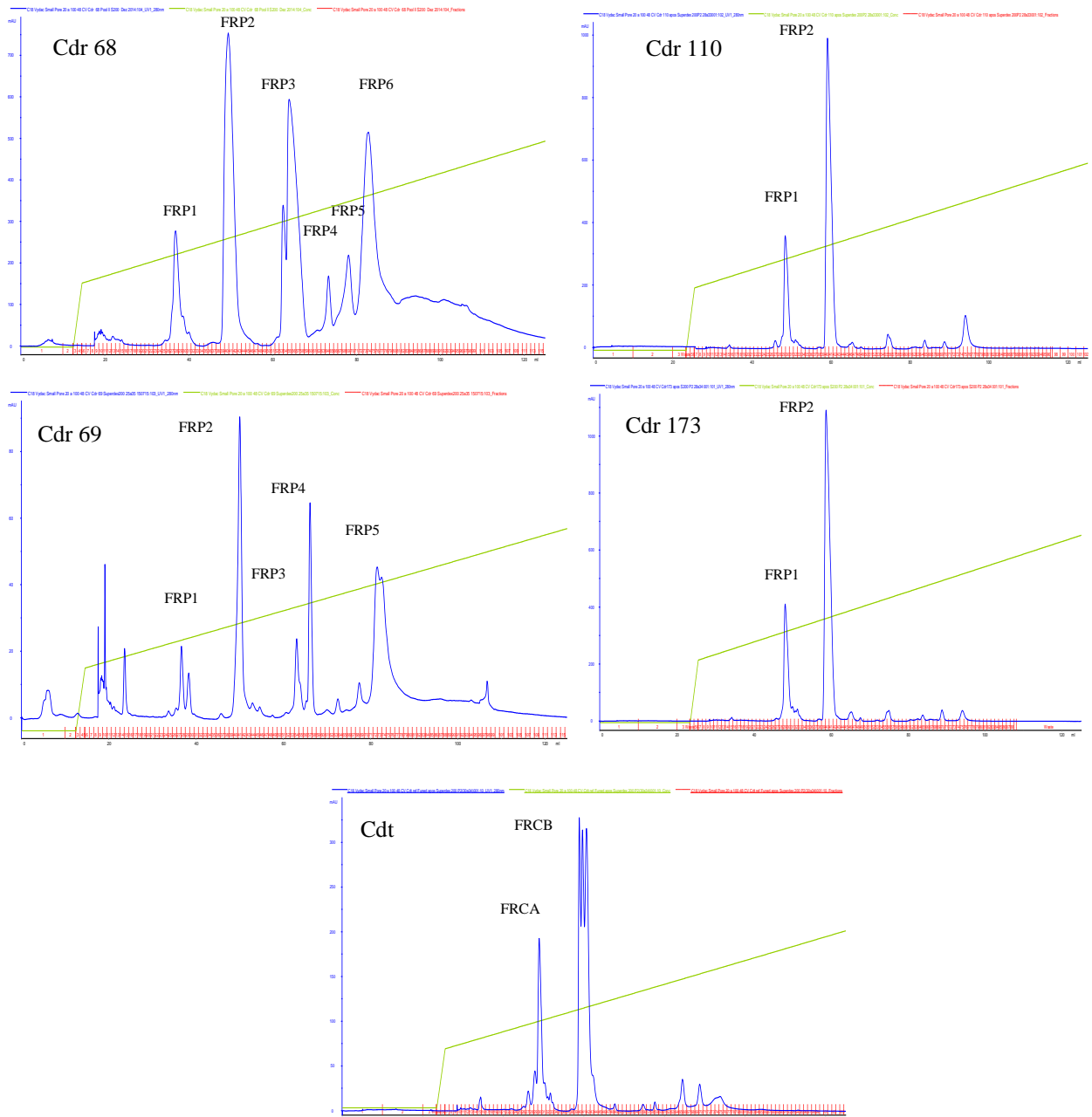


Figura 9. Perfis cromatográficos em fase reversa dos picos II (PII) obtidos por exclusão molecular no fracionamento dos venenos amarelos Cdr68 e Cdr69, brancos Cdr110 e Cdr173 e Cdt (referência). As ordenadas representam as leituras em mAU280 (em azul) ou percentual do gradiente de acetonitrila (em verde). A abcissa mostra o volume de eluição (em mL).

Os perfis da cromatografia de Fase Reversa do pico II de Cdr68, obtido na etapa de exclusão molecular, estão expressos na figura 10 de três formas: a) Pico II completo (25 a 34); b) Pico II somente das frações que apresentaram atividade fosfolipásica (PIAF) (27 a 34); c) Pico II somente das frações que apresentaram citotoxicidade (PIAC) (25 e 26).

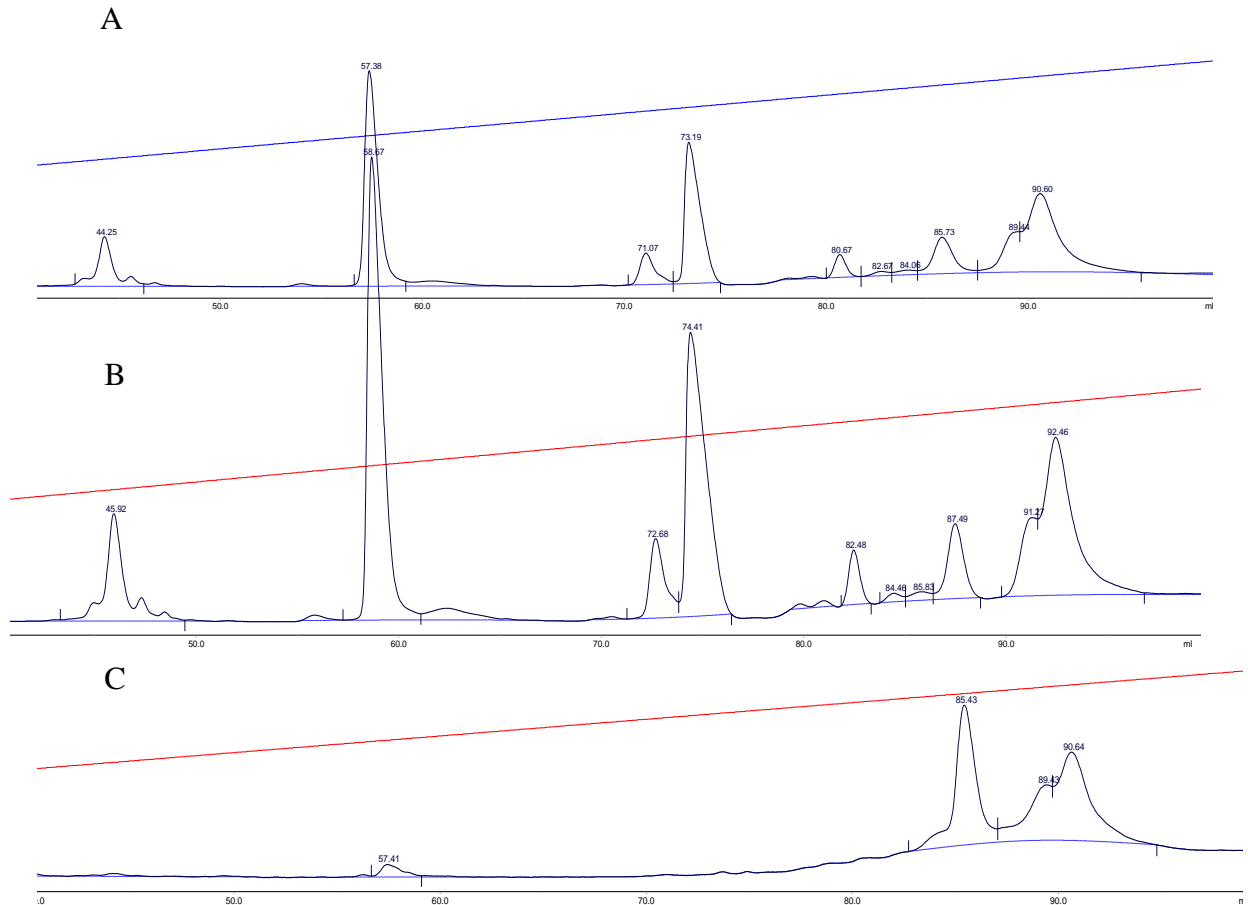


Figura 10. Alinhamento dos perfis cromatográficos em Fase Reversa de (A) Pico II completo; (B) Pico II somente das frações que apresentaram atividade fosfolipásica (PIAF); (C) Pico II somente das frações que apresentaram citotoxicidade (PIAC) obtidos no fracionamento de Cdr68 por exclusão molecular. A abcissa é o volume de eluição (mL) e a ordenada representa mAU280.

Os dados quantitativos referentes aos picos obtidos na cromatografia de Fase Reversa do veneno Cdr68 estão demonstrados na Tabela 3.

Tabela 3. Dados quantitativos referentes aos picos da Fase Reversa de Cdr68.

	Pico	Retenção (mL)	Área (mAU*mL)	Área relativa	Altura (mAU)
PII	1	44.25	57.78	7.77	58.98
	2	57.38	200.78	27.00	256.62
	3	71.07	33.13	4.46	37.64
	4	73.19	149.23	20.07	168.28
	5	80.67	17.88	2.40	27.21
	6	82.67	4.74	0.64	5.18
	7	84.06	6.27	0.84	5.69
	8	85.73	51.09	6.87	43.56
	9	89.44	45.79	6.16	48.05
	10	90.6	176.86	23.79	93.28
Total			743.54	100.00	
PIIAF	1	45.92	104.75	8.97	91.11
	2	58.67	335.94	28.78	392.90
	3	72.68	59.66	5.11	67.38
	4	74.41	272.36	23.33	241.10
	5	82.48	29.34	2.51	46.33
	6	84.46	5.95	0.51	7.34
	7	85.83	8.25	0.71	7.37
	8	87.49	59.79	5.12	63.61
	9	91.27	60.74	5.20	66.41
	10	92.46	230.57	19.75	134.09
Total			1167.33	100.00	
PIIAC	1	57.41	4.60	3.57	3.84
	2	85.43	50.91	39.56	41.97
	3	89.43	24.24	18.84	16.68
	4	90.64	48.95	38.04	26.55
Total			128.70	100	

3.2.1. Atividade Fosfolipásica A₂

Para os picos da Fase Reversa dos venenos Cdr68 e Cdr69, o conteúdo proteico de cada pico FRP foi ajustado para leitura de $A_{280} = 0,200$, para obter as atividades relativas de cada um. Como controle positivo foi utilizado o veneno de *Crotalus durissus terrificus*. Em Cdr68, com exceção de FRP1 e FRP6, todos os outros picos (FRP2 a FRP5) apresentaram atividade fosfolipásica, sendo que o FRP3 foi o que apresentou maior atividade relativa. No veneno Cdr69 o FRP4 apresentou maior atividade relativa (Tabela 4).

Tabela 4. Atividade fosfolipásica dos picos cromatográficos originados da Fase Reversa dos venenos Cdr68 e Cdr69.

Veneno	Fração RPC	Halo de hidrólise (mm)	Atividade PLA2 relativa
Cdr68	FRP1	n.d.	n.d.
	FRP2	8.13	1 X
	FRP3	23.0	3 X
	FRP4	15.5	2 X
	FRP5	15.0	2 X
	FRP6	n.d.	n.d.
Cdr 69	FRP1	n.d.	n.d.
	FRP2	7.55	1 X
	FRP3	4.39	0.6 X
	FRP4	19.2	2.5 X
	FRP5	5.0	0.7 X
CP		7.54	1.0 X
CN		-	-

Valores dos halos de hidrólise expresso em média de duplicatas.

3.2.2. Atividade Coagulante sobre plasma e sobre fibrinogênio

Todos os picos oriundos da Fase Reversa de Cdr68 e Cdr69 foram submetidos aos testes de atividade coagulante sobre o plasma (2,8 g/L), porém não apresentaram atividade coagulante em até 10 min (tabela 5). Os Picos FRP4, 5 e 6 do veneno Cdr 68 e os picos FR3, 4, e 5 do Cdr69 coagularam o plasma somente após 24h de incubação.

Tabela 5. Atividade coagulante de picos obtidos a partir de Fase Reversa do PicoII da Exclusão Molecular de Cdr68 e Cdr69.

Picos (100µg/ml)	Atividade coagulante (min)
Cdr68	
FRP1	>10 min
FRP2	>10 min
FRP3	>10 min
FRP4	>10 min*
FRP5	>10 min*
FRP6	>10 min*
Cdr69	
FRP1	>10 min
FRP2	>10 min
FRP3	>10 min*
FRP4	>10 min*
FRP5	>10 min*

*Picos que apresentaram coagulação depois de 24h.

Os picos, que induziram a coagulação do plasma em 24 horas, foram testadas sobre o fibrinogênio. FRP4 e 5 do Cdr68 e o FRP3 do Cdr69 também formaram rede de fibrina após 24 horas.

3.2.3. Avaliação da citotoxicidade pelo método Alamar Blue

Todos os picos da Fase Reversa (FRP) de Cdr68 e 69 foram submetidos ao ensaio de citotoxicidade em linhagens de células HCT-116 e MRC-5 nas concentrações de 5, 20, 40 e 100 µg/mL. Somente na última concentração (100 µg/mL) o FRP2 foi citotóxico para ambos os venenos. Observa-se que os venenos foram mais citotóxicos para MRC-5 do que para HCT-116. No entanto, quando comparadas as atividades citotóxicas para a linhagem HCT-116, o FRP2 de Cdr69 foi mais tóxico ($p \leq 0,05$) (Fig. 11).

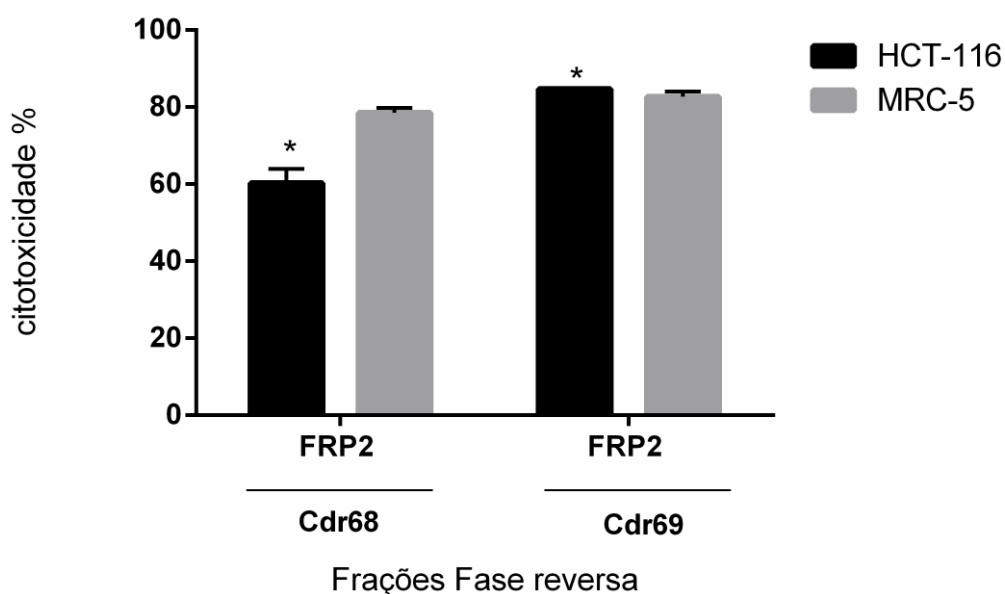


Figura 11. Ensaio de citotoxicidade em células de fibroblasto humano linhagem MRC-5 e carcinoma colorretal linhagem HCT-116 realizado com os picos FRP2 da Fase Reversa de Cdr68 e Cdr69 (100 µg/mL).

O pico II (Cromatografia de Exclusão Molecular) de Cdr68 foi submetido à Cromatografia de Fase Reversa de três formas: a) pico II completo (frações 25 a 34), b) frações com atividade fosfolipásica A₂ (PIIAF) (27 a 34) e c) frações com atividade citotóxica (PIIAC) (25 e 26), os picos resultantes também foram avaliados quanto à atividade citotóxica. Os picos AF-2 e AF-4 de PIIAF foram citotóxicos, sendo que AF-2 foi igualmente citotóxica para HCT-116 e MRC-5 e a AF-4 foi citotóxica somente para HCT-116. As frações de PIIAC não foram citotóxicas para as linhagens testadas (Fig. 12).

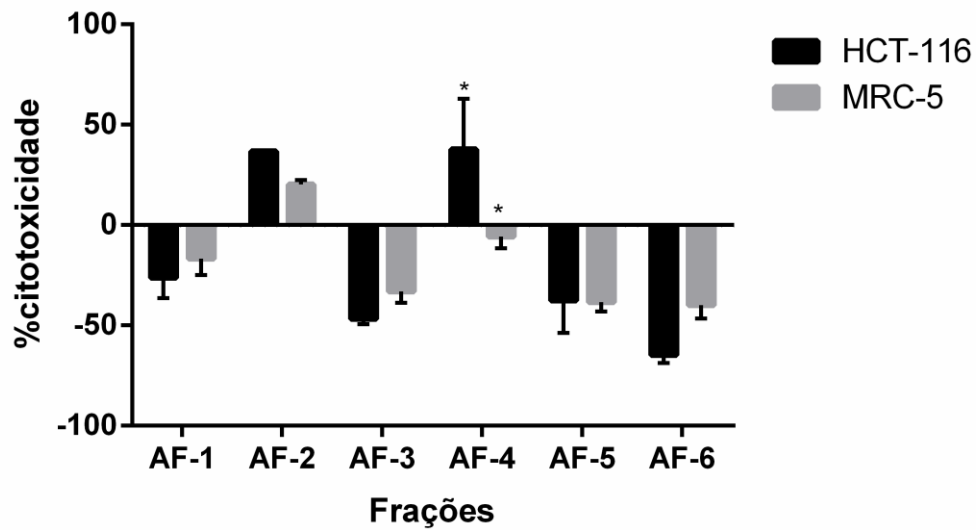


Figura 12. Citotoxicidade de frações obtidas da Fase Reversa do Pico IIAF da Exclusão Molecular, sendo que AF-2 foi igualmente citotóxica para HCT-116 e MRC-5 e a AF-4 foi citotóxica somente para HCT-116.

3.2.4. Atividade Antimicrobiana

O pico FRP2 do Cdr68 obtido na cromatografia de Fase Reversa foi submetido ao teste de microdiluição para avaliar suas atividades frente à cepa de *Staphylococcus aureus* 25923 (Figura 13). Quando comparado ao controle positivo nas concentrações de 25; 12,5 e 6,25 FRP2 teve atividade semelhante à do controle positivo, não sendo diferente estatisticamente ($p > 0.05$). Em todas as outras concentrações, a atividade antibacteriana do FRP2 foi menor que a do controle positivo, sendo diferentes estatisticamente ($p < 0.05$).

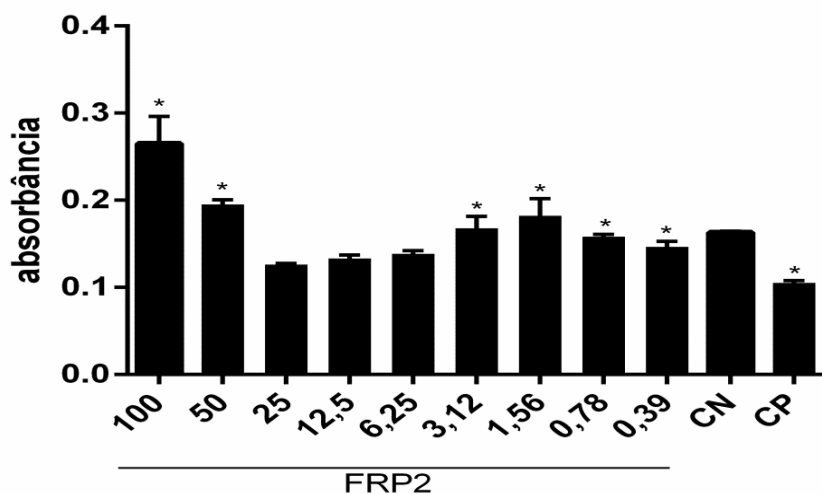


Figura 13. Inibição do crescimento bacteriano do FRP2 da Fase Reversa de Cdr68, frente à cepa *Staphylococcus aureus* 25923. A placa foi lida em espectrofotômetro a 625nm, sendo a absorbância inversamente proporcional a morte bacteriana.

3.3. Espectrometria de massa

A espectrometria de massa foi realizada nos picos cromatográficos de Fase Reversa derivados de PII da etapa de Exclusão Molecular dos venenos amarelos (Cdr68 e Cdr 69), para os quais foi observada atividade PLA₂.

As figuras 14 e 16 correspondem aos espectros de massa de Cdr68 e Cdr69, respectivamente, adquiridos em faixa de 2.000 a 16.000 m/z. Os picos em torno de 14 m/z correspondem à PLA₂ com carga unitária e o pico com cerca de metade dessa massa corresponde à carga dupla da PLA₂. As figuras 15 e 17 referem-se a m/z superiores a 20.000, sugerindo a presença de oligômeros nas amostras. Outros picos detectados pelo equipamento são devidos, provavelmente, à presença de isoformas de PLA₂ presentes no PicoII dos venenos amarelos (Cdr68 e Cdr69) ou contaminantes em pequena escala.

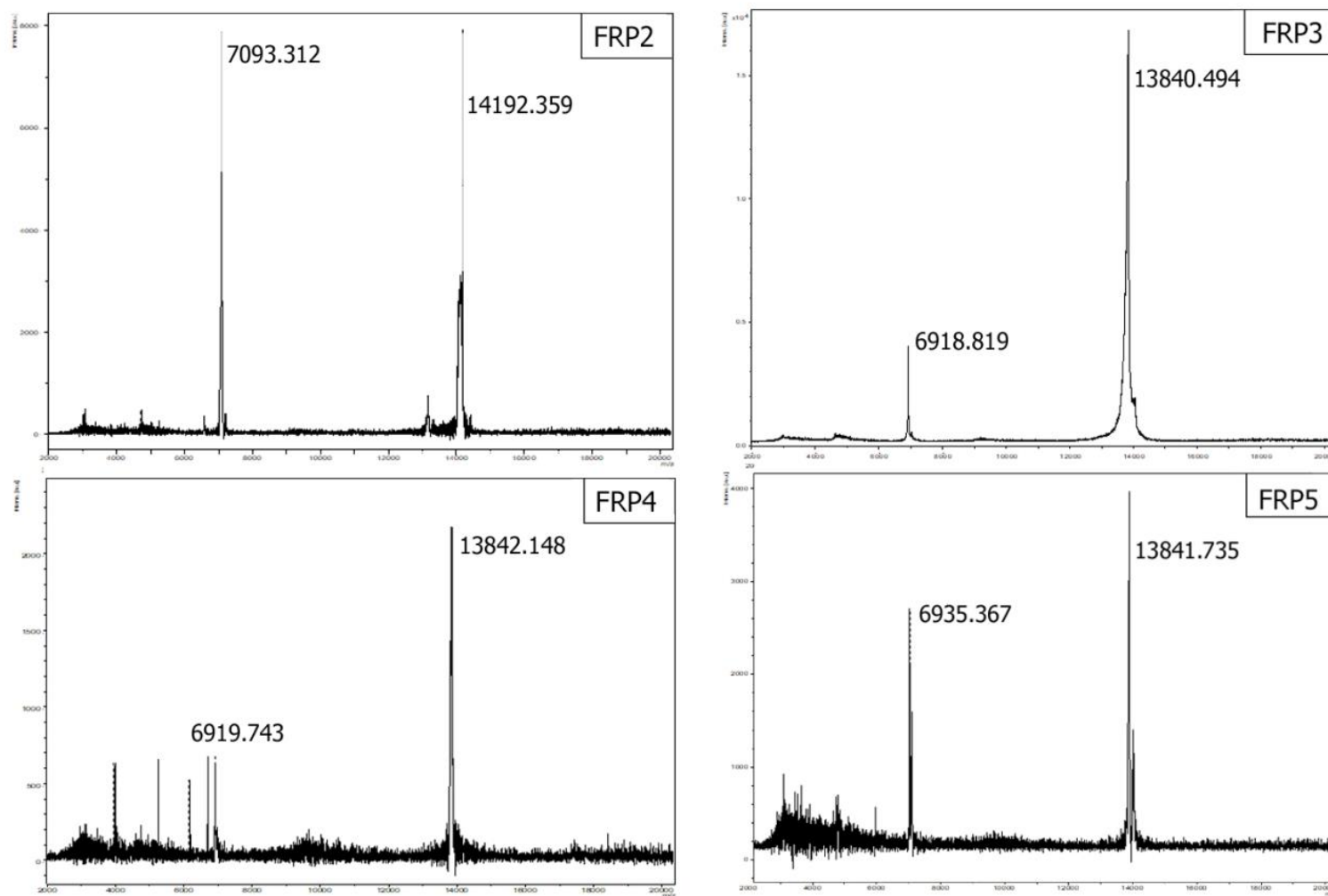


Figura 14. Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de fase reversa de Cdr68, adquiridos na faixa m/z 2000-16000. Os picos de maior intensidade estão identificados.

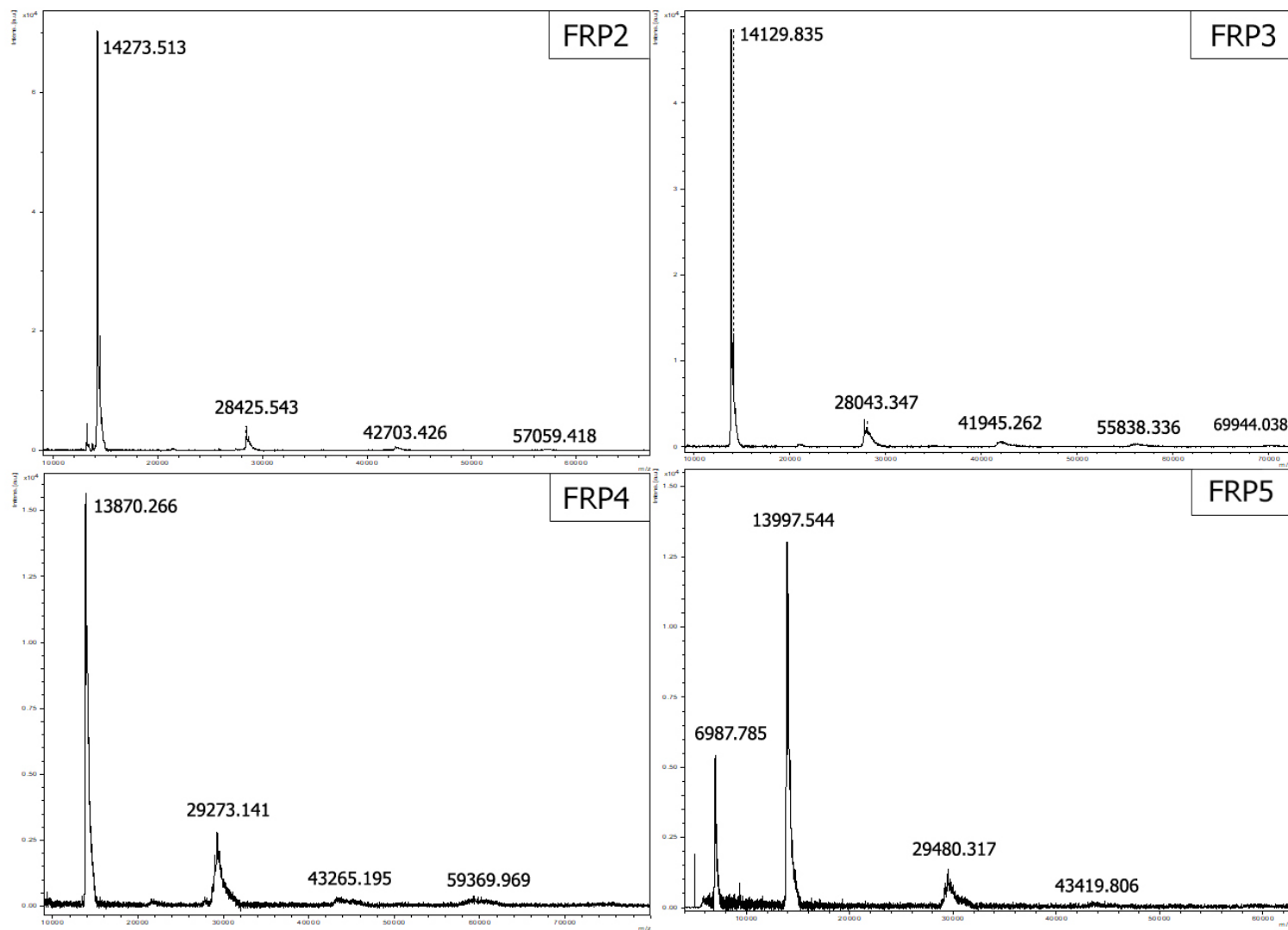


Figura 15. Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de Fase Reversa de Cdr68, adquiridos na faixa m/z 14000-100000. Os picos de maior intensidade estão identificados

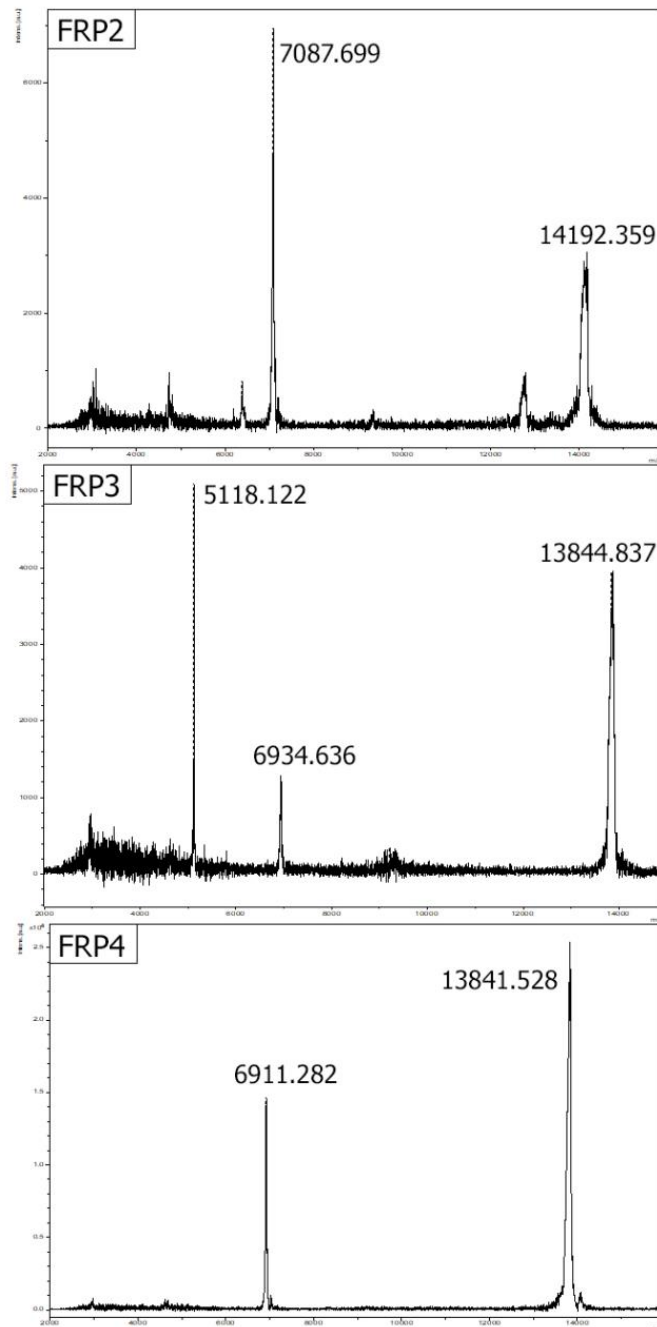


Figura 16. Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de fase reversa de Cdr69, adquiridos na faixa m/z 2000-16000. Os picos de maior intensidade estão identificados pela relação m/z.

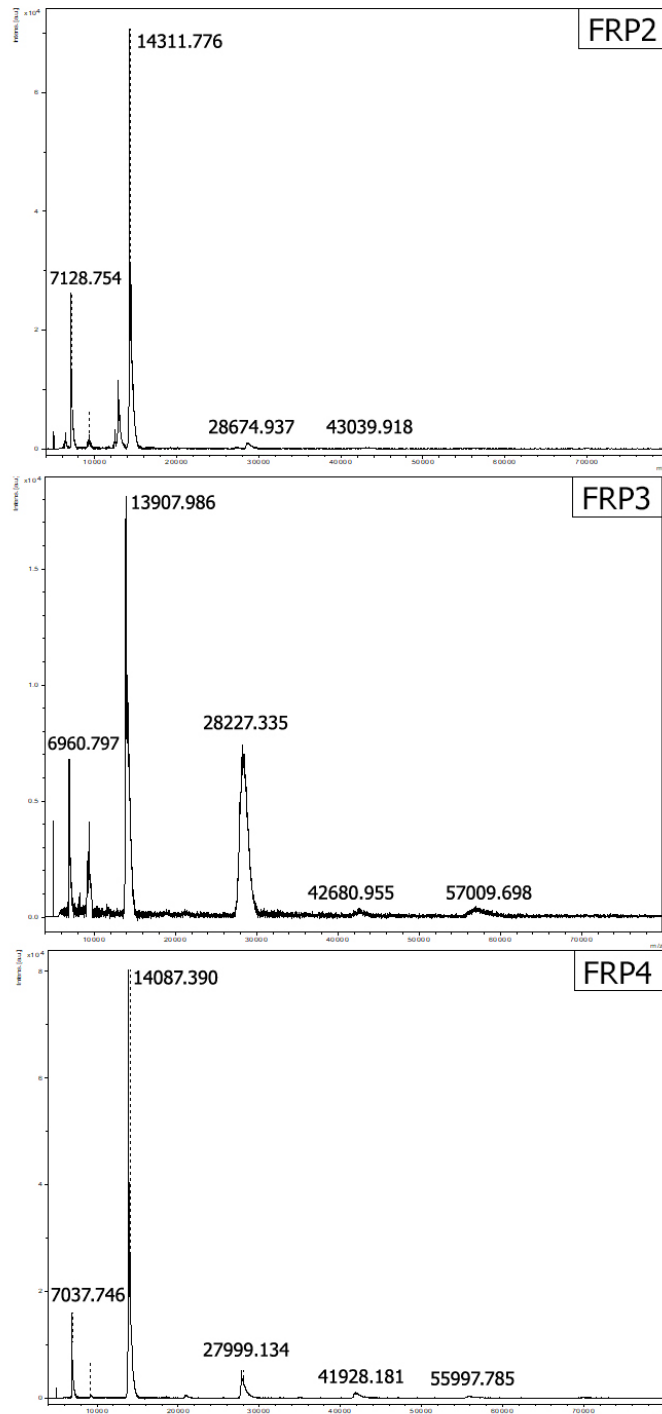


Figura 17. Espectros de massa em MALDI/TOF/TOF das frações da cromatografia de Fase Reversa de Cdr69, adquiridos na faixa m/z 14000-100000. Os picos de maior intensidade estão identificados.

As tabelas 6 e 7 resumam os principais picos identificados nas amostras das cromatografias de Fase Reversa por espectrometria de massas com aquisição em faixa menor (2.000 a 16.000 m/z), enquanto as tabelas 8 e 9 resumam os principais picos em aquisição de faixa maior (14.000 a 100.000), para Cdr68 e Cdr69.

Tabela 6. Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr68 em faixa de aquisição de 2.000 a 16.000 m/z.

Fração de Cdr68	m/z	Tempo	Intensidade	Intensidade Relativa (%)
FRP2	3080,265	63625,00	491,700	0,062
	4717,433	78672,00	233,172	0,030
	6587,479	92906,00	358,994	0,046
	7085,631	96341,00	5140,702	0,653
	7093,312	96393,00	7875,474	1,000
	13160,980	131134,00	555,709	0,071
	14175,822	136074,00	3188,071	0,405
	14192,359	136153,00	4845,750	0,615
FRP3	6912,011	95158,00	2439,000	0,147
	6918,819	95204,67	3916,676	0,235
	13813,214	134330,00	12542,000	0,753
	13825,818	134391,00	15687,000	0,942
	13840,494	134462,00	16648,000	1,000
FRP4	3957,381	72081,00	130,168	0,060
	5245,969	82945,00	661,173	0,307
	6137,613	89690,00	61,261	0,028
	6688,807	93615,00	106,163	0,049
	6919,743	95211,00	616,371	0,286
	13827,884	134401,00	1934,850	0,898
	13842,148	134470,00	2153,575	1,000
FRP5	6935,367	95318,00	718,114	0,186
	13824,578	134385,00	2786,286	0,722
	13841,735	134468,00	3859,309	1,000
	13967,950	135077,00	1079,730	0,280
	13980,000	135135,00	1254,896	0,325
	13997,046	135217,00	924,079	0,239

Tabela 7. Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr69 em faixa de aquisição de 2.000 a 16.000 m/z

Fração de Cdr69	m/z	Tempo	Intensidade	Intensidade Relativa (%)
FRP2	2969,672	62477,00	437,071	0,092
	3024,619	63050,00	817,771	0,173
	3079,974	63622,00	1033,586	0,218
	4730,566	78781,00	962,129	0,203
	6379,027	91430,00	382,614	0,081
	7087,699	96355,00	4734,721	1,000
	7144,381	96738,00	1218,864	0,257
	9355,917	110643,00	326,307	0,069
	12787,110	129266,00	917,836	0,194
	14091,403	135670,00	2482,414	0,524
	14192,359	136153,00	2903,443	0,613
14294,519	136640,00	739,571	0,156	
FRP3	2946,523	62234,00	729,757	0,213
	5118,122	81932,00	1478,693	0,432
	6934,636	95313,00	1289,207	0,377
	9199,507	109718,00	145,343	0,042
	13844,837	134483,00	3422,429	1,000
FRP4	2966,333	62442,00	723,686	0,029
	4597,213	77667,00	340,529	0,013
	6911,282	95153,00	8811,043	0,347
	13841,528	134467,00	25381,571	1,000
	14080,138	135616,00	1207,064	0,048
FRP5	2910,882	61858,00	719,414	0,050
	2966,523	62444,00	14294,929	1,000
	3033,681	63144,00	939,929	0,066
	3173,317	64575,00	1168,914	0,082
	5113,733	81897,00	808,407	0,057
	5138,587	82095,00	713,779	0,050
FRP6	2505,570	57417,00	104,407	0,177
	2546,329	57879,50	183,762	0,311
	2802,327	60702,00	220,589	0,373
	2849,357	61206,00	132,485	0,224
	2917,334	61927,00	466,368	0,789
	2962,377	62400,00	591,325	1,000
	3488,036	67666,50	147,974	0,250
	4692,544	78335,00	92,872	0,157
	5404,567	83946,00	99,203	0,168
5834,182	87132,00	85,836	0,145	

Tabela 8. Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr68 em faixa de aquisição de 14.000 a 100.000 m/z.

Fração de Cdr68	m/z	Tempo	Intensidade	Intensidade Relativa (%)
FRP2	13205,077	74916,00	3594,000	0,218
	14273,513	77850,00	16493,750	1,000
	14461,978	78356,00	12367,750	0,750
	28425,543	109470,00	1937,000	0,117
	42703,426	133960,00	674,000	0,041
	57059,418	154700,00	268,500	0,016
FRP3	13787,683	76530,00	3317,500	0,462
	14129,835	77462,00	7179,500	1,000
	21063,348	94366,00	325,000	0,045
	27699,928	108076,00	993,000	0,138
	28043,347	108738,00	2013,000	0,280
	41945,262	132774,00	610,000	0,085
	55838,336	153046,00	321,000	0,045
	69944,038	171176,00	196,000	0,027
FRP4	9279,756	62956,00	262,500	0,017
	13870,266	76756,00	15655,250	1,000
	21509,444	95350,00	232,000	0,015
	28996,279	110554,00	1923,500	0,123
	29273,141	111076,00	2745,500	0,175
	43265,195	134832,00	315,000	0,020
	45502,567	138250,00	210,000	0,013
	59369,969	157782,00	304,000	0,019
FRP5	4945,994	46219,00	19,000	0,002
	6987,785	54757,00	5184,500	0,414
	9338,818	63153,00	605,500	0,048
	13851,609	76705,00	10803,000	0,862
	13997,544	77103,00	12533,000	1,000
	29480,317	111465,00	1261,000	0,101
	43419,806	135071,00	179,500	0,014

Tabela 9. Sumário dos dados de espectrometria de massas (Maldi/TOF) das frações cromatográficas de Fase Reversa de Cdr69 em faixa de aquisição de 14.000 a 100.000 m/z.

Fração de Cdr69	m/z	Tempo	Intensidade	Intensidade Relativa (%)
FRP2	4984,530	46395,00	3017,250	0,097
	6381,760	52371,00	2793,500	0,090
	7128,754	55297,00	13073,750	0,421
	9131,583	62459,00	1556,000	0,050
	9378,498	63285,00	1652,000	0,053
	12300,238	72337,00	490,000	0,016
	12809,941	73801,00	11631,250	0,375
	14311,776	77953,00	31038,250	1,000
	27053,668	106819,00	314,000	0,010
	28674,937	109945,00	1074,500	0,035
43039,918	134483,00	279,000	0,009	
FRP3	4988,480	46413,00	1983,000	0,109
	6960,797	54653,00	3336,188	0,184
	8194,854	59219,00	621,500	0,034
	9345,426	63175,00	2900,000	0,160
	13907,986	76859,00	18165,875	1,000
	28227,335	109091,00	7407,500	0,408
	42680,955	133925,00	297,000	0,016
	57009,698	154633,00	437,875	0,024
FRP4	4880,217	45917,00	35,000	0,001
	7037,746	54949,00	5578,500	0,207
	9101,913	62359,00	244,500	0,009
	14087,390	77347,00	26944,750	1,000
	20932,319	94075,00	608,000	0,023
	27999,134	108653,00	3790,000	0,141
	41928,081	132747,00	1083,500	0,040
	55997,785	153263,00	417,000	0,015
	69708,382	170889,00	202,000	0,007

4. Discussão

Para o isolamento e identificação dos constituintes responsáveis pelas atividades citotóxicas, em linhagem celular de Carcinoma colorretal, e antibacteriana (Capítulo 2), presentes nos venenos individuais amarelos de *Crotalus durissus ruruima* (Cdr68 e Cdr69), foram utilizadas duas etapas cromatográficas: Cromatografia de Exclusão Molecular seguida de Cromatografia de Fase Reversa. Primeiramente foi realizada Cromatografia de Exclusão Molecular, também conhecida como filtração em gel, que separa biomoléculas com base nas diferenças em seu tamanho molecular (COLLINS, 2011); e em seguida, o segundo passo cromatográfico foi a Fase Reversa, que separa as moléculas de acordo com características de hidrofobicidade (MOLNÁR; HORVÁTH, 1976).

A cromatografia de Exclusão Molecular dos venenos Cdr68, Cdr69, Cdr110 e Cdt, resultaram em quatro picos principais, no entanto as frações tiveram tempos de retenções diferentes. TAKEDA et al. (1985) após o fracionamento do veneno de *C. d. terrificus* em Sephdex G-75 também obteve quatro picos com massa molecular variando de 150.000 a 4.000 Da. Apesar de se tratarem de venenos de serpentes da mesma espécie, estas diferenças no perfil cromatográfico, podem ser explicadas pelo fato de que, a composição química quantitativa e qualitativa dos venenos pode sofrer variações intraespécies que podem ocorrer devido a fatores como localização geográfica, sazonalidade, dieta, idade e sexo (CHIPPAUX et al., 1991). Além dessas variações existe a intrapopulacional que já foi descrita para os venenos de *Crotalus durissus ruruima* (DOS-SANTOS et al., 2005), sendo que quatro venenos caracterizados no artigo citado foram utilizados no presente estudo (Cdr 68, 69, 110 e 173).

Vários autores utilizaram também Cromatografia de Exclusão Molecular seguida de Cromatografia de Fase Reversa para obtenção de crotoxinas e fosfolipase A₂ de venenos crotálico, principalmente da espécie *Crotalus durissus* (BEGHINI et al., 2000; CALVETE et al., 2010; MULLER et al., 2012). PONCE-SOTO et al. (2007) utilizaram um protocolo diferente de purificação usando exclusivamente a Fase Reversa, para isolamento de PLA₂ de *Crotalus durissus ruruima*, e obtiveram dezoito frações, sendo que duas apresentaram atividade PLA₂. Posteriormente DIZ FILHO et al. (2009) utilizaram cromatografia de Exclusão Molecular seguida de Fase Reversa, para isolamento e purificação de duas isoformas de fosfolipases A₂ a partir do veneno branco de *Crotalus durissus ruruima*, o mesmo protocolo de isolamento foi usado por FONSECA et al. (2010), demonstrando que estas etapas cromatográficas são eficientes no isolamento de fosfolipases A₂ de venenos crotálicos.

Os fracionamentos em Cromatografia de Fase Reversa dos picos II de *Crotalus durissus terrificus* (Cdt) e dos venenos brancos (Cdr110 e Cdr 173) deram origem a dois picos, sendo estes correspondentes a crotapotina (pico I) e PLA₂ (pico II), sendo possível observar, no pico II de Cdt, a presença de isoformas de fosfolipases A₂. A Fase Reversa dos picos II dos venenos Cdr68 e Cdr69 resultaram em seis e cinco picos, respectivamente.

Ao analisar a atividade fosfolipásica A₂ ao longo do cromatograma de Exclusão Molecular, observa-se que a atividade fosfolipásica dos venenos amarelos está deslocada para o “ombro” direito do pico II o que foi confirmado no perfil eletroforético, pela presença de proteínas de massa molecular de 14 kDa correspondente a PLA₂ e este dado não foi observado para os venenos brancos.

Os picos II de Cdr68 e de Cdr69 submetidos à cromatografia de fase reversa originaram seis e cinco picos, respectivamente, que foram avaliados quanto à atividade fosfolipásica A₂. Os picos FRP2, FRP3, FRP4 e FRP5, do Cdr68, e os FRP2, FRP3, FRP4 e FRP5, do Cdr69 foram os que apresentaram atividade PLA₂. Os picos FRP3 do Cdr68 apresentou atividade relativa três vezes maior do que a PLA₂ de *Crotalus durissus terrificus*, utilizada como controle positivo. Esses dados confirmam os relatados no trabalho de DOS-SANTOS et al., 2005 no qual o veneno 68 apresentou maior atividade fosfolipásica A₂ do que o 69, 173 e 110.

Quando submetidos à espectrometria de massas, os picos com atividade fosfolipásica A₂ apresentaram massas de aproximadamente 14kDa, sugerindo que se tratam de isoformas de fosfolipases. FAURE; BON (1987) ao comparar o perfil cromatográfico de amostras individuais e de pool de venenos de *C. d. terrificus*, demonstraram que cada serpente pode sintetizar de cinco a dez isoformas diferentes de crotoxina em proporções relativas variáveis, sugerindo que as serpentes podem ter vários genes que codificam esta toxina. Os mesmos autores ao fracionar a crotoxina obtiveram duas isoformas de crotapotina e quatro isoformas de PLA₂, a reassociação dessas isoformas, originou oito crotoxinas, com diferenças em suas letalidades e atividades biológicas (FAURE; BON, 1988).

A partir do veneno *Crotalus durissus ruruima* foram isoladas duas isoformas de PLA₂, a análise comparativa dessa atividade enzimática entre as duas isoformas mostrou diferenças e características farmacológicas particulares (PONCE-SOTO et al., 2007; DIZ FILHO et al., 2009). A análise das sequências de aminoácidos amino-terminais das PLA₂ de *C. d. ruruima*, demonstrou que estas são semelhantes às de *C. d. terrificus* enquanto as PLA₂ de *C. d. cumanensis* apresentaram maior homologia com as PLA₂ de *C. d. cascavella* e de *C. d. collilineatus* (FONSECA, 2011).

Os venenos crotálicos apresentam ação coagulante, devido a enzima trombina-símile, ou giroxina, uma proteína de cadeia única, com massa molecular de aproximadamente 34 kDa, que atua sobre o fibrinogênio humano, clivando-o, sendo responsável pela incoagulabilidade sanguínea, observada em pacientes que sofreram acidente ofídico por *Crotalus durissus terrificus* (RAW et al., 1986). As frações resultantes da Cromatografia de Exclusão Molecular de Cdr68 e Cd69 foram submetidas a teste de coagulação em plasma e fibrinogênio. As frações 33 e 34 de Cdr68 tiveram maior ação coagulante do que as mesmas frações de Cd69, corroborando os resultados de DOS SANTOS et al., (2005). As duas frações que apresentaram atividade sobre o fibrinogênio em Cdr68 e Cdr69 estavam presentes no pico

II da Cromatografia de Exclusão Molecular, sugerindo se tratar da enzima trombina-simile, porém, após a cromatografia de fase reserva desse pico, não foi observada atividade, no tempo previsto, de dez minutos. Os picos FRP4, 5 e 6 de Cdr68 e os picos FRP3, 4 e 5 de Cdr69 formaram coágulo somente após 24 horas, indicando que essa atividade é parcialmente perdida, durante esse processo cromatográfico. Para a obtenção de trombina-similes, outras etapas cromatográficas como a Cromatografia de Exclusão Molecular seguida de Cromatografia de Afinidade, podem ser utilizadas (BARROS et al., 2011).

Os venenos de serpentes possuem uma série de proteínas e peptídeos com efeitos antimicrobianos, dentre eles as enzimas fosfolipases A₂ e os peptídeos antimicrobianos como a crotamina (DE OLIVEIRA JUNIOR et al., 2013). Esta atividade antimicrobiana de maneira geral ocorre por permeabilização ou ruptura de parede e de membrana celular (SAMY et al., 2015). A atividade antibacteriana de FRP2 (100 a 0,39 µg/mL) foi testada frente à bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus* e em todas as concentrações testadas foi observada atividade antimicrobiana. A PLA₂ de *C. d. ruruima* apresentou atividade contra a bactéria Gram-negativa *Xantomonas axopodis pv passiflorae* de maneira independente da ação enzimática, pois ao utilizar EDTA como quelante de Ca²⁺, a atividade não foi inibida, indicando que o sítio enzimático da fosfolipase A₂ não participa nessa atividade (DIZ FILHO et al., 2009). O componente B (PLA₂) da peçonha de *C. d. terrificus* apresentou atividade frente a cepas de *Staphylococcus aureus*, *Escherichia coli*, *Pseudomonas aeruginosa* e *Enterobacter aerogenes* (SOARES et al., 2001; PERUMAL SAMY et al., 2007).

A crotamina isolada do veneno de *C. d. terrificus* exibiu atividade antibacteriana contra cepas de *E. coli* (OGUIURA et al., 2011), segundo os pesquisadores, a morte se deu pela permeabilização da membrana.

Outras proteínas como crotapotina isolada do veneno de *Crotalus durissus cascavella* apresentou atividade contra *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae*, uma bactéria Gram-negativa, porém foi menos eficaz contra o *Claribacteri ssp*, uma bactéria Gram-positiva, provavelmente devido a diferenças na parede celular destas bactérias (OLIVEIRA et al., 2003). No veneno dessa mesma subespécie, a enzima L-amino ácido oxidase (LAO), inibiu o crescimento da bactéria gram-negativa *Xanthomonas axonopodis pv. passiflorae* (TOYAMA et al., 2006). O estudo de proteínas e peptídeos antimicrobianos em venenos de serpentes os torna fortes candidatos para o desenvolvimento de novas drogas

As frações 25 e 26 (Pico II) de Cdr68 e a fração 25 (Pico I) do Cdr69 resultantes da Cromatografia de Exclusão Molecular foram citotóxicas tanto para HCT-116 como para MRC-5, sendo que as frações 25 do Cdr68 e do Cdr69 foram mais citotóxica para

Carcinoma colorretal (HCT-116) e a fração 26 (Cdr68) foi igualmente citotóxica para ambas as linhagens. Como no veneno Cdr69 uma única fração, a 25, presente no Pico I foi citotóxica, esta fração foi separada para posterior sequenciamento. Porém, utilizamos os picos II da Cromatografia de Exclusão Molecular de ambos os venenos para a Cromatografia de Fase Reversa, para a obtenção de Fosfolipases A₂. As citotoxicidades dos picos da Fase Reversa também foram avaliadas frente às linhagens de células HCT-116 e MRC-5. Embora os picos de FRP2 a FRP5 de ambos os venenos tenham apresentado atividade fosfolipásica A₂, foi verificado que apenas os picos FRP2 foram citotóxicos para as duas linhagens, sendo mais citotóxico para a linhagem não tumoral (MRC-5) do que para HCT-116 na concentração de 100 µg/mL. FAURE; BON (1988) ao demonstrarem que os venenos podem ter isoformas de crotapotina e PLA₂ que se combinam entre si para formar crotoxina, dividiu as fosfolipases A₂ em duas classes: A) as que apresentam menor atividade enzimática e maior potência farmacológica; e B) as com maior atividade enzimática e menor potência farmacológica. Ao analisar os resultados das atividades fosfolipásica A₂ e citotóxicas, avaliadas no presente estudo, conclui-se que os picos FRP2, estão inseridos no grupo “A”.

Quando as citotoxicidade dos venenos totais amarelos de Cdr68 e de Cdr69 (capítulo anterior) foram comparadas com as dos picos ou frações isoladas observa-se que venenos totais apresentaram maior toxicidade e especificidade para a linhagem de carcinoma colorretal (HCT-116). O fato do pico AF-4 do Cdr68 ser citotóxico apenas para linhagem de carcinoma colorretal sugere que esta fração pode ser responsável pela especificidade observada no veneno total, porém a potente citotoxicidade observada neste veneno deva ser um efeito sinérgico entre outros componentes que foram separados durante os processos cromatográficos. Corroborando com o descrito acima, os picos resultantes da Cromatografia de Fase Reversa de PIIAC não apresentarem citotoxicidade.

Os resultados obtidos demonstram que o veneno total perde sua especificidade para a linhagem de Carcinoma colorretal e a intensidade da atividade citotóxica durante as etapas cromatográficas. No entanto, o veneno total poderia ser utilizado acoplado a nanopartículas, que poderiam aumentar a especificidade, pois podem ser direcionadas para as células-alvo, melhorando desta forma o índice terapêutico, intensidade de ação, além de reduzir sua toxicidade (BARRATT, 2003), como foi descrito para outros venenos (AL-SADOON et al., 2013; BADR et al., 2014).

Conclusões

- Os venenos brancos Cdr110 e Cdr173 de *Crotalus durissus ruruima*, não têm atividade antibacteriana frente às cepas de *Staphylococcus aureus*, *Staphylococcus epidermidis*, *Escherichia coli*, *Klebsiella pneumoniae* e *Pseudomonas aeruginosa*.
- Os venenos brancos Cdr110 e Cdr173 não foram citotóxicos para as linhagens celulares SK-Mel 103 (melanoma), MCF-7 (adecarcinoma de mama), HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCR-5 (fibroblasto humano), nas concentrações testadas.
- Os venenos amarelos Cdr68 e Cdr69 de *Crotalus durissus ruruima*, inibiram o crescimento da bactéria Gram-positiva *Staphylococcus aureus*.
- O pool de venenos amarelos (Cdr68+Cdr69) apresentou citotoxicidade contra todas as linhagens testadas: SK-Mel 103 (melanoma), MCF-7 (adecarcinoma de mama), HCT-116 (carcinoma colorretal) e MCR-5 (fibroblasto humano), sendo que a linhagem de Carcinoma colorretal (HCT-116) foi mais sensível para esta mistura de venenos.
- Os venenos amarelos Cdr68 e Cdr69 induzem alterações morfológicas como: encolhimento das células, núcleo picnótico, condensação da cromatina, vacuolização do citoplasma nas células Carcinoma colorretal (HCT-116).
- O fracionamento por Exclusão Molecular dos venenos brancos de *Crotalus durissus ruruima* revelou que estes têm perfis proteicos mais semelhantes ao de *Crotalus durissus terrificus*, do que dos amarelos de sua própria subespécie, *C. d. ruruima*.
- Os picos FRP2 de Cdr68 e de Cdr9, com massa em torno de 14 kDa, apresentaram atividade fosfolipásica, citotóxica frente a HCT-116 e MRC-5, e antibacteriana contra *Staphylococcus aureus*.
- Os venenos totais de Cdr68 e de Cdr9 foram mais eficazes do que suas frações isoladas demonstrando uma ação sinérgica entre os seus constituintes.

REFERÊNCIAS

AHMED, S. A.; GOGAL, R. M.; WALSH, J. E. A new rapid and simple non-radioactive assay to monitor and determine the proliferation of lymphocytes an alternative to [3H] thymidine incorporation assay. **Journal of immunological methods**, v. 170, n. 2, p. 211-224, 1994.

AL-SADOON, M. K.; RABAH, D. M.; BADR, G. Enhanced anticancer efficacy of snake venom combined with silica nanoparticles in a murine model of human multiple myeloma: molecular targets for cell cycle arrest and apoptosis induction. **Cell Immunol**, v. 284, n. 1-2, p. 129-38, 2013.

ARNI, R. K.; WARD, R. J. Phospholipase A2—a structural review. **Toxicon**, v. 34, n. 8, p. 827-841, 1996.

BADR, G.; SAYED, D.; MAXIMOUS, D.; MOHAMED, A. O.; GUL, M. Increased Susceptibility to Apoptosis and Growth Arrest of Human Breast Cancer Cells Treated by a Snake Venom-Loaded Silica Nanoparticles. **Cellular Physiology and Biochemistry**, v. 34, n. 5, p. 1640-1651, 2014.

BARRATT, G. Colloidal drug carriers: achievements and perspectives. **Cellular and Molecular Life Sciences CMLS**, v. 60, n. 1, p. 21-37, 2003.

BARROS, L.; SOARES, A.; COSTA, F.; RODRIGUES, V.; FULY, A.; GIGLIO, J.; GALLACCI, M.; THOMAZINI-SANTOS, I.; BARRAVIERA, S.; BARRAVIERA, B.; FERREIRA JUNIOR, R. Biochemical and biological evaluation of gyroxin isolated from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 17, p. 23-33, 2011.

BEGHINI, D. G.; TOYAMA, M. H.; HYSLOP, S.; SODEK, L. C.; NOVELLO; MARANGONI, S. Enzymatic Characterization of a Novel Phospholipase A2 from *Crotalus durissus cascavella* Rattlesnake (Maracambóia) Venom. **Journal of Protein Chemistry**, v. 19, n. 8, p. 679-684, 2000.

BIEBER, A. L. Metal and Nonprotein Constituents in Snake Venoms. In: LEE, C.-Y. (Eds.). **Snake Venoms**. Berlin, Heidelberg: Springer Berlin Heidelberg, 1979. p. 295-306.

BREITHAUPT, H.; RUBSAMEN, K.; HABERMANN, E. Biochemistry and pharmacology of the crotoxin complex. Biochemical analysis of crotopotin and the basic *Crotalus* phospholipase A. **Eur J Biochem**, v. 49, n. 2, p. 333-45, 1974.

BURKE, J. E.; DENNIS, E. A. Phospholipase A2 structure/function, mechanism, and signaling. **Journal of Lipid Research**, v. 50, n. Supplement, p. S237-S242, 2009.

CALVETE, J. J.; SANZ, L.; CID, P.; DE LA TORRE, P.; FLORES-DÍAZ, M.; DOS SANTOS, M. C.; BORGES, A.; BREMO, A.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; ALAPE-GIRÓN, A.; GUTIÉRREZ, J. M. Snake Venomics of the Central American Rattlesnake *Crotalus simus* and the South American *Crotalus durissus* Complex Points to Neurotoxicity as an Adaptive Paedomorphic Trend along *Crotalus* Dispersal in South America. **Journal of Proteome Research**, v. 9, n. 1, p. 528-544, 2010.

CHIPPAUX, J. P.; WILLIAMS, V.; WHITE, J. Snake venom variability: methods of study, results and interpretation. **Toxicon**, v. 29, n. 11, p. 1279-1303, 1991.

CLINICAL AND LABORATORY STANDARDS INSTITUTE. Methods for Dilution Antimicrobial Susceptibility Tests for Bacteria That Grow Aerobically; Approved Standard—Sixth Edition. NCCLS document M7-A6 (ISBN 1-56238-486-4). NCCLS, 940 West. Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA., 2003.

COLLINS, C. H. Separações em colunas abertas: cromatografia por exclusão e por bioafinidade. **Scientia Chromatographica**, v. 3, n. 2, p. 107-114, 2011.

DE OLIVEIRA JUNIOR, N. G.; E SILVA CARDOSO, M. H.; FRANCO, O. L. Snake venoms: attractive antimicrobial proteinaceous compounds for therapeutic purposes. **Cell Mol Life Sci**, v. 70, n. 24, p. 4645-58, 2013.

DIZ FILHO, E. B. S.; MARANGONI, S.; TOYAMA, D. O.; FAGUNDES, F. H. R.; OLIVEIRA, S. C. B.; FONSECA, F. V.; CALGAROTTO, A. K.; JOAZEIRO, P. P.; TOYAMA, M. H. Enzymatic and structural characterization of new PLA2 isoform isolated from white venom of *Crotalus durissus ruruima*. **Toxicon**, v. 53, n. 1, p. 104-114, 2009.

DOS-SANTOS, M. C.; ASSIS, E. B.; MOREIRA, T. D.; PINHEIRO, J.; FORTES-DIAS, C. L. Individual venom variability in *Crotalus durissus ruruima* snakes, a subspecies of *Crotalus durissus* from the Amazonian region. **Toxicon**, v. 46, n. 8, p. 958-961, 2005.

ELOFF, J. N. A sensitive and quick microplate method to determine the minimal inhibitory concentration of plant extracts for bacteria. **Planta Med**, v. 64, p. 711-713, 1998.

FAURE, G.; BON, C. Several isoforms of crotoxin are present in individual venoms from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*. **Toxicon**, v. 25, n. 2, p. 229-234, 1987.

FAURE, G.; BON, C. Crotoxin, a phospholipase A2 neurotoxin from the South American rattlesnake *Crotalus durissus terrificus*: purification of several isoforms and comparison of their molecular structure and of their biological activities. **Biochemistry**, v. 27, n. 2, p. 730-738, 1988.

FONSECA, F. V. **Modificação estrutural de PLA2 de *Crotalus durissus ruruima* e *Crotalus durissus cumanensis* com p-bromofenacil e cumarinas sintéticas – Caracterização bioquímica e biológica. Estudo da agregação plaquetária e efeito edematogênico.** Campinas. 2011. p. Instituto de Biologia, Universidade Estadual de Campinas.

FONSECA, F. V.; BALDISSERA JR, L.; CAMARGO, E. A.; ANTUNES, E.; DIZ-FILHO, E. B. S.; CORRÊA, A. G.; BERIAM, L. O. S.; TOYAMA, D. O.; COTRIM, C. A.; TOYAMA, M. H. Effect of the synthetic coumarin, ethyl 2-oxo-2H-chromene-3-carboxylate, on activity of *Crotalus durissus ruruima* sPLA2 as well as on edema and platelet aggregation induced by this factor. **Toxicon**, v. 55, n. 8, p. 1527-1530, 2010.

FRAENKEL-CONRAT, H.; JENG, T. W.; HSIANG, M. **BIOLOGICAL ACTIVITIES OF CROTOXIN AND AMINO ACID SEQUENCE OF CROTOXIN B.** 1980. v. 561-567 p.

GUTIÉRREZ, J. M.; LOMONTE, B. Phospholipases A2: Unveiling the secrets of a functionally versatile group of snake venom toxins. **Toxicon**, v. 62, n. Supplement C, p. 27-39, 2013.

HABERMANN, E.; HARDT, K. L. A sensitive and specific plate test for the quantitation of phospholipases. **Anal Biochem**, v. 50, n. 1, p. 163-73, 1972.

HENDON, R. A.; FRAENKEL-CONRAT, H. Biological roles of the two components of crotoxin. **Proc Natl Acad Sci**, v. 68, p. 1560-1563, 1971.

JESÚS BALSINDE; MARÍA A. BALBOA; PAUL A. INSEL, A.; DENNIS, E. A. REGULATION AND INHIBITION OF PHOSPHOLIPASE A2. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 39, n. 1, p. 175-189, 1999.

KINI, R. M.; EVANS, H. J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases. **Toxicon**, v. 27, 1989.

LOMONTE, B.; ANGULO, Y.; SANTAMARÍA, C. Comparative study of synthetic peptides corresponding to region 115–129 in Lys49 myotoxic phospholipases A2 from snake venoms. **Toxicon**, v. 42, n. 3, p. 307-312, 2003.

MARAGANORE, J. M.; MERUTKA, G.; CHO, W.; WELCHES, W.; KÉZDY, F. J.; HEINRIKSON, R. L. A new class of phospholipases A2 with lysine in place of aspartate 49. Functional consequences for calcium and substrate binding. **Journal of Biological Chemistry**, v. 259, n. 22, p. 13839-43, 1984.

MARTINS, A. M. C.; TOYAMA, M. H.; HAVT, A.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Determination of *Crotalus durissus cascavella* venom components that induce renal toxicity in isolated rat kidneys. **Toxicon**, v. 40, n. 8, p. 1165-1171, 2002.

MOLNÁR, I.; HORVÁTH, C. Reverse-phase chromatography of polar biological substances: separation of catechol compounds by high-performance liquid chromatography. **Clinical Chemistry**, v. 22, n. 9, p. 1497-1502, 1976.

MULLER, V. D. M.; RUSSO, R. R.; OLIVEIRA CINTRA, A. C.; SARTIM, M. A.; DE MELO ALVES-PAIVA, R.; FIGUEIREDO, L. T. M.; SAMPAIO, S. V.; AQUINO, V. H. Crotoxin and phospholipases A2 from *Crotalus durissus terrificus* showed antiviral activity against dengue and yellow fever viruses. **Toxicon**, v. 59, n. 4, p. 507-515, 2012.

NUNES, F. P. B.; ZYCHAR, B. C.; DELLA-CASA, M. S.; SAMPAIO, S. C.; GONÇALVES, L. R. C.; CIRILLO, M. C. Crotoxin is responsible for the long-lasting anti-inflammatory effect of *Crotalus durissus terrificus* snake venom: involvement of formyl peptide receptors. **Toxicon**, v. 55, n. 6, p. 1100-1106, 2010.

NÚÑEZ, V.; ARCE, V.; GUTIÉRREZ, J. M. A.; LOMONTE, B. Structural and functional characterization of myotoxin I, a Lys49 phospholipase A2 homologue from the venom of the snake *Bothrops atrox*. **Toxicon**, v. 44, n. 1, p. 91-101, 2004.

OGUIURA, N.; BONI-MITAKE, M.; AFFONSO, R.; ZHANG, G. In vitro antibacterial and hemolytic activities of crotoamine, a small basic myotoxin from rattlesnake *Crotalus durissus*. **The Journal of Antibiotics**, v. 64, p. 327-331, 2011.

OLIVEIRA, D. G.; TOYAMA, M. H.; MARTINS, A. M. C.; HAVT, A.; NOBRE, A. C. L.; MARANGONI, S.; CÂMARA, P. R.; ANTUNES, E.; DE NUCCI, G.; BELIAM, L. O. S.; FONTELES, M. C.; MONTEIRO, H. S. A. Structural and biological characterization of a crotoapotin isoform isolated from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 42, n. 1, p. 53-62, 2003.

PERUMAL SAMY, R.; GOPALAKRISHNAKONE, P.; THWIN, M. M.; CHOW, T. K.; BOW, H.; YAP, E. H.; THONG, T. W. Antibacterial activity of snake, scorpion and bee venoms: a comparison with purified venom phospholipase A2 enzymes. **J Appl Microbiol**, v. 102, n. 3, p. 650-9, 2007.

POLGÁR, J.; MAGNENAT, E. M.; PEITSCH, M. C.; WELLS, T. N. C.; CLEMETSON, K. J. Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-Mr phospholipases A2: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). **Biochemical Journal**, v. 319, n. 3, p. 961-968, 1996.

PONCE-SOTO, L. A.; BALDASSO, P. A.; ROMERO-VARGAS, F. F.; WINCK, F. V.; NOVELLO, J. C.; MARANGONI, S. Biochemical, Pharmacological and Structural Characterization of Two PLA2 Isoforms Cdr-12 and Cdr-13 from *Crotalus durissus ruruima* Snake Venom. **The Protein Journal**, v. 26, n. 1, p. 39-49, 2007.

RAW, I.; ROCHA, M. C.; ESTEVES, M. I.; KAMIGUTI, A. S. Isolation and characterization of a thrombin-like enzyme from the venom of *Crotalus durissus terrificus*. **Braz J Med Biol Res**, v. 19, n. 3, p. 333-8, 1986.

RODRIGUES, R. S.; IZIDORO, L. F.; DE OLIVEIRA, R. J., JR.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Snake venom phospholipases A₂: a new class of antitumor agents. **Protein Pept Lett**, v. 16, n. 8, p. 894-8, 2009.

SALVADOR, G. H. M., SANTOS, J. I., LOMONTE, B., FONTES, M. R. M. Crystal structure of a phospholipase A₂ from *Bothrops asper* venom: Insights into a new putative "myotoxic cluster". **Biochimie**, v.133, p. 95-102, 2017.

SAMY, R. P.; STILES, B. G.; CHINNATHAMBI, A.; ZAYED, M. E.; ALHARBI, S. A.; FRANCO, O. L.; ROWAN, E. G.; KUMAR, A. P.; LIM, L. H.; SETHI, G. Viperatoxin-II: A novel viper venom protein as an effective bactericidal agent. **FEBS Open Bio**, v. 5, p. 928-41, 2015.

SIX, D. A.; DENNIS, E. A. The expanding superfamily of phospholipase A₂ enzymes: classification and characterization. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids**, v. 1488, n. 1-2, p. 1-19, 2000.

SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; CECCHINI, A. L.; ARANTES, E. C.; FRANÇA, S. C.; GUTIÉRREZ, J. M.; GIGLIO, J. R. Effects of chemical modifications of crotoxin B, the phospholipase A₂ subunit of crotoxin from *Crotalus durissus terrificus* snake venom, on its enzymatic and pharmacological activities. **The International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 33, n. 9, p. 877-888, 2001.

TAKEDA, A. K.; BARBOSA, S. F. C.; COSTA, L. M. D.; ADELINO, M. D. G. F. Fracionamento do veneno *Crotalus durissus terrificus* por cromatografia de exclusão molecular. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 27, p. 115-122, 1985.

THEAKSTON, R. D.; REID, H. A. Development of simple standard assay procedures for the characterization of snake venom. **Bull World Health Organ**, v. 61, n. 6, p. 949-56, 1983.

TORRES, A. F. C.; DANTAS, R. T.; TOYAMA, M. H.; FILHO, E. D.; ZARA, F. J.; RODRIGUES DE QUEIROZ, M. G.; PINTO NOGUEIRA, N. A.; ROSA DE OLIVEIRA, M.; DE OLIVEIRA TOYAMA, D.; MONTEIRO, H. S. A.; MARTINS, A. M. C.

Antibacterial and antiparasitic effects of *Bothrops marajoensis* venom and its fractions: Phospholipase A2 and l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 55, n. 4, p. 795-804, 2010.

TOYAMA, M. H.; DE OLIVEIRA, D. G.; BERIAM, L. O. S.; NOVELLO, J. C.; RODRIGUES-SIMIONI, L.; MARANGONI, S. Structural, enzymatic and biological properties of new PLA2 isoform from *Crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 41, n. 8, p. 1033-1038, 2003.

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new l-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**, v. 47, n. 1, p. 47-57, 2006.

YAN, C.-H.; LIANG, Z.-Q.; GU, Z.-L.; YANG, Y.-P.; REID, P.; QIN, Z.-H. Contributions of autophagic and apoptotic mechanisms to CrTX-induced death of K562 cells. **Toxicon**, v. 47, n. 5, p. 521-530, 2006.

ZAMBELLI, V. O.; SAMPAIO, S. C.; SUDO-HAYASHI, L. S.; GRECO, K.; BRITTO, L. R. G.; ALVES, A. S.; ZYCHAR, B. C.; GONÇALVES, L. R. C.; SPADACCI-MORENA, D. D.; OTTON, R.; DELLA-CASA, M. S.; CURI, R.; CURY, Y. Crotoxin alters lymphocyte distribution in rats: Involvement of adhesion molecules and lipoxigenase-derived mediators. **Toxicon**, v. 51, n. 8, p. 1357-1367, 2008.

ZHANG, H.-L.; HAN, R.; CHEN, Z.-X.; CHEN, B.-W.; GU, Z.-L.; REID, P. F.; RAYMOND, L. N.; QIN, Z.-H. Opiate and acetylcholine-independent analgesic actions of crotoxin isolated from *crotalus durissus terrificus* venom. **Toxicon**, v. 48, n. 2, p. 175-182, 2006.