



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Estudo comparativo do efeito leishmanicida de duas L-aminoácido  
oxidases isoladas de peçonhas botrópicas**

**Aluna:** Luana Gonçalves Barbosa

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Renata Santos Rodrigues

**Co-Orientadora:** Dra. Tássia Rafaella Costa

**UBERLÂNDIA - MG**

**2019**



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Estudo comparativo do efeito leishmanicida de duas L-aminoácido  
oxidases isoladas de peçonhas botrópicas**

**Aluna:** Luana Gonçalves Barbosa

**Orientadora:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Renata Santos Rodrigues

**Co-Orientadora:** Dra. Tássia Rafaella Costa

**Dissertação apresentada à  
Universidade Federal de  
Uberlândia como parte dos  
requisitos para obtenção do  
Título de Mestre em Genética e  
Bioquímica (Área Bioquímica)**

**UBERLÂNDIA - MG**

**2019**

Ficha Catalográfica Online do Sistema de Bibliotecas da UFU  
com dados informados pelo(a) próprio(a) autor(a).

B238 Barbosa, Luana Gonçalves, 1994-  
2019 Estudo comparativo do efeito leishmanicida de duas L-  
aminoácido oxidases isoladas de peçonhas botrópicas [recurso  
eletrônico] / Luana Gonçalves Barbosa. - 2019.

Orientador: Renata Santos Rodrigues.  
Coorientador: Tássia Rafaella Costa.  
Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Pós-graduação em Genética e Bioquímica.  
Modo de acesso: Internet.  
Disponível em: <http://dx.doi.org/10.14393/ufu.di.2019.2098>  
Inclui bibliografia.

1. Genética. I. Santos Rodrigues, Renata, 1977-, (Orient.). II.  
Costa, Tássia Rafaella, 1982-, (Coorient.). III. Universidade Federal  
de Uberlândia. Pós-graduação em Genética e Bioquímica. IV.  
Título.

CDU: 575

Bibliotecários responsáveis pela estrutura de acordo com o AACR2:  
Gizele Cristine Nunes do Couto - CRB6/2091  
Nelson Marcos Ferreira - CRB6/3074



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
**INSTITUTO DE BIOTECNOLOGIA**  
**PÓS-GRADUAÇÃO EM GENÉTICA E BIOQUÍMICA**

**Estudo comparativo dos efeitos leishmanicidas de duas L-aminoácido  
oxidases isoladas de peçonhas botrópicas**

**ALUNA:** Luana Gonçalves Barbosa

**COMISSÃO EXAMINADORA**

**Presidente:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Renata Santos Rodrigues  
(Orientadora)

**Examinadores:** Prof<sup>a</sup>. Dra. Daiana Silva Lopes

Prof<sup>a</sup>. Dra. Débora Cristina de Oliveira Nunes

**Data da Defesa:** 25 / 07 / 2019

As sugestões da Comissão Examinadora e as Normas PGGB para o formato da Dissertação/Tese foram contempladas

Renata Santos Rodrigues

---

(NOME DA ORIENTADORA)

## Dedicatória

♥ Às, Dra. Tássia Rafaella Costa, Me. Mônica Soares Costa e Me.  
Isabela Pacheco Borges

Dedico este trabalho de forma igualitária, às três, pela co-orientação, por toda instrução, ajuda, salvamento, aprendizado, parceria e amizade em todos os momentos. Não teria como ter desenvolvido esse mestrado sem vocês, todas três foram de extrema importância tanto para o projeto quanto pra minha vida, cada uma contribuindo com algo diferente, mas que pra mim teve a mesma magnitude. Agradeço **imensamente** por cada dia, cada experimento e convivência dentro e fora do laboratório, saibam que as levarei, juntamente com toda a experiência que eu tive neste trabalho, **para sempre** porque vocês e todo o período que estivemos juntas trouxeram tamanho crescimento na minha vida. São exemplos de pessoas e profissionais que me mostraram tanta dedicação, compromisso, seriedade, sabedoria e muito companheirismo, principalmente nos momentos mais desesperadores. Palavras jamais serão suficientes para expressar a gratidão que eu sinto a Deus, por ter colocado vocês no meu caminho, e à vocês. Serei eternamente grata por tudo e saibam que àqueles que, assim como eu, podem ou puderem aprender com vocês são e serão privilegiados. Desejo o melhor de Deus pra cada uma e uma vida cheia de realizações, sucesso e crescimento. Contem sempre comigo.

♥ Aos meus pais Núbia e Gilberto;

por serem minha base e meus exemplos de pessoas; por sempre acreditarem em mim e me apoiarem em cada escolha e decisão que tomei; pela presença de vocês em todos os momentos da minha vida, me trazendo alegria, conforto e proteção. Sou muito sortuda, porque sei que sempre oram por mim e em cada passo que eu doou, sei que posso contar com cada um em tudo na minha vida. Amo vocês.

♥ Ao meu namorado Guilherme;

por estar ao meu lado fazendo de tudo para que os meus dias terminassem bem e felizes, principalmente quando me comprava pizza; pelo companheirismo em todos os momentos, bons e difíceis; por sempre estar disponível para me ouvir desabafar e ao mesmo tempo me aconselhar pensando sempre no melhor para minha vida. Agradeço pelo cuidado, atenção e interesse que você demonstra por mim e pelo o que eu tenho a dizer, principalmente quando eu explico sobre os experimentos, não importa se não entende, você sempre ouve com a maior atenção. Você é meu porto seguro, minha calma, meu parceiro, e eu não seria ou teria nada se não fosse por você.

♥ À minha irmã Geovana e meu cunhado Welton;

por toda torcida e incentivo, pelas palavras de apoio e momentos felizes que fizeram com que essa trajetória fosse mais fácil. Agradeço a paciência e parceria de vocês, principalmente quando tinham que me esperar de fora do laboratório nos fins de semana e durante a escrita da dissertação.

♥ À minha sogra, Elaine;

a considero como uma segunda mãe pra mim e agradeço por toda ajuda, cuidado e preocupação que teve e tem comigo. Sempre com uma palavra de incentivo, ajuda, se colocando à disposição para quando eu precisasse, me deixando confortável e bem alimentada. Obrigada por tudo.

## Agradecimentos

Há certas circunstâncias que acontecem e não sabemos o porquê, e em algumas das vezes os acontecimentos nem sempre são fáceis de entender ou aceitar no início. Durante o período de mestrado, o que mais experimentei foram desafios e dificuldades, mas sempre acreditei que nada acontece por acaso, e mesmo demorando a entender o motivo, sempre soube que tudo tem um propósito. Nesses dois anos aprendi que determinados fatos melhoram áreas da nossa vida que nem imaginávamos; que acontecem coisas que não queremos, mas temos de aceitar; que mesmo a situação sendo desesperadora, temos que ter fé; que por mais ruim e difícil que tudo pareça, sempre tem algo novo para aprender; e o que temos de mais importante na vida são as **pessoas**. Não é à toa que um dos ensinamentos de Deus é amar ao próximo, porque pessoas te surpreendem, te salvam, nos fazem sentir seguros e mostram que não estamos perdidos ou sozinhos. O que vale a pena é não desistir, percorrer o caminho com as pessoas certas e fazer tudo com amor, pois como diz Thomas Kempis: “O amor não sente obrigações, não pensa em nada sobre seus problemas, tenta o que estiver acima de sua força, não defende desculpas para a impossibilidade; para isso acredita que todas as coisas são legítimas por si mesmas e que todas as coisas são possíveis”.

Todas as pessoas a quem dedico esse trabalho e cada um que agradeço, tiveram uma contribuição fundamental para este projeto e também pra minha vida.

- ♥ Agradeço primeiramente à Deus, por todas as bênçãos que recebi e por cada pequeno milagre diário, porque sem Ele não teria forças e nem disposição, mas por causa dEle, jamais desisti. Hoje vejo que tudo que Ele proporcionou foi para meu crescimento, amadurecimento e para aumentar mais a minha fé.
- ♥ À professora Dra. Renata Santos Rodrigues por ter me aceitado novamente no laboratório, me orientando e mostrando a beleza desse

caminho acadêmico e científico; por estar presente sempre que eu precisei, pelo aprendizado, parceria, confiança, alegria. Obrigada por sempre estar disposta a me ajudar, por não me deixar desesperar e me incentivar a não desistir; por sempre ter um plano B, C, D... etc., quantos fossem necessários para que eu concluísse meu trabalho com total apoio e orientação. Tenho muita admiração por você como pessoa e profissional, muito do que eu aprendi e consegui na minha vida acadêmica foi graças a você, levarei tudo isso eternamente e serei sempre grata por tudo.

- ♥ À professora Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila por toda disposição em me ajudar e socorrer, principalmente nos momentos mais difíceis. Sou imensamente grata por sempre me atender, conversar, ensinar, me valorizar e contribuir para o meu crescimento. Aprendi muito com você e sempre a terei como exemplo de pessoa e profissional.
- ♥ À Dra. Fernanda Gobbi Amorim do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional da Universidade de Vila Velha (UVV - ES) e ao Dr. Ricardo Pereira Rodrigues do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo, pela disposição e imensa ajuda com as análises estruturais, de sequenciamento e de bioinformática.
- ♥ À Me. Bruna Cristina Borges do laboratório de Osteoimunologia e Imunologia dos Tumores – Instituto de Ciências Biomédicas (UFU), pela simpatia, boa convivência e por toda a ajuda com os experimentos/análises do citômetro. Obrigada por sempre me atender com disposição e alegria; pelas explicações e por contribuir para melhorar meu trabalho.
- ♥ Às professoras Dra. Cássia Regina da Silva e Dra. Kelly Aparecida Geraldo Yoneyama Tadini, por todo o auxílio com animais, materiais e reagentes para a realização dos experimentos.
- ♥ Ao professor Dr. Flávio Henrique Silva (UFSCar) e a Dra. Danyelle Toyama (UFSCar) pela disponibilidade em me receber no laboratório e por todo aprendizado na área de biologia molecular.



- ♥ Aos professores do IBTEC que contribuíram imensamente para meu conhecimento acadêmico.
- ♥ À Anna Cecília, minha “irmã de laboratório” por toda a ajuda com os experimentos, pela amizade e convivência alegre, pela disposição em contribuir sempre, pelo aprendizado e parceria. Desejo tudo de melhor na sua vida.
- ♥ Aos colegas de laboratório Lorena, Vitor, Fernanda, Joice, Lucas, Marina, Thiago, Samuel, Priscilla, Thamires, Thalissa, Túlio, Isabela, Mônica e Tássia pela boa convivência e ajuda em experimentos.
- ♥ Às técnicas Marina e Sebastiana, pela boa convivência, ajuda e por sempre proporcionarem um ambiente de trabalho adequado.
- ♥ Aos funcionários do IBTEC, em especial a Janaína, por sempre me atenderem e solucionarem meus problemas quando precisei, vocês são muito eficientes.
- ♥ Ao CNPq (Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico) pelo suporte financeiro.
- ♥ À todos que direta e indiretamente contribuíram para realização deste trabalho.

"O que está por trás de nós e o que está na nossa frente são coisas minúsculas se comparadas com o que está dentro de nós".

Ralph Waldo Emerson

## Índice

Resumo .....	xiii
Abstract.....	xv
Lista de Figuras.....	xvii
Lista de Tabelas .....	xxi
Lista de abreviaturas.....	xxii
<b>1. INTRODUÇÃO.....</b>	<b>1</b>
<b>1.1. Aspectos gerais sobre serpentes peçonhentas .....</b>	<b>1</b>
<b>1.2. Composição das peçonhas de serpentes .....</b>	<b>5</b>
<b>1.3. Características principais de serpentes peçonhentas do gênero <i>Bothrops</i>.....</b>	<b>10</b>
1.3.1. Peçonha de <i>Bothrops jararacussu</i> .....	12
1.3.2. Peçonha da <i>Bothrops moojeni</i> .....	13
<b>1.4. L-aminoácido oxidases (LAAOs e SV-LAAOs) .....</b>	<b>14</b>
<b>1.5. Características gerais dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> e ciclo biológico</b>	<b>17</b>
<b>2. OBJETIVO .....</b>	<b>22</b>
2.1. Objetivo geral .....	22
2.2. Objetivos específicos .....	22
<b>3. MATERIAL E MÉTODOS .....</b>	<b>23</b>
3.1. Purificação das LAAOs botrópicas BjussuLAAO-II e BmooLAAO .....	23
3.2. Atividade específica de LAAO .....	25
3.3. Sequenciamento das LAAOs por espectrometria de massas .....	26
3.4. Análises <i>in silico</i> .....	27
3.5. Cultivo dos parasitos .....	27
3.6. Ensaio de citotoxicidade .....	28
3.7. Ensaio antiproliferativo .....	28
3.8. Avaliação da alteração do potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) nos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	29
3.9. Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	30
3.10. Análises estatísticas .....	31
<b>4. RESULTADOS .....</b>	<b>31</b>
4.1. Purificação das SV-LAAOs botrópicas e atividade específica de LAAO para cada enzima .....	31
4.2. Sequenciamento das LAAOs por espectrometria de massas .....	34
4.3. Análises <i>in silico</i> .....	38
4.4. Avaliação do efeito citotóxico de BjussuLAAO-II e BmooLAAO sobre parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	39

4.5. Quantificação de atividade LAAO específica utilizando como substrato L-leucina e meio LIT completo .....	44
4.6. Avaliação dos efeitos de BjussuLAAO-II e BmooLAAO na proliferação dos parasitos do gênero <i>Leishmania</i> .....	46
4.7. Avaliação da alteração do potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dos parasitos promovida pela BjussuLAAO-II e BmooLAAO .....	48
4.8. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular produzidas por parasitos tratados com as SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO .....	50
5. DISCUSSÃO .....	53
6. CONCLUSÃO .....	63
7. REFERÊNCIAS .....	64
APÊNDICE .....	84

## Resumo

L-aminoácido oxidases são flavoenzimas oxidorreduções que utilizam L-aminoácidos como substrato, para catálise estereoespecífica em  $\alpha$ -cetoácidos, liberando amônia ( $\text{NH}_3$ ) e peróxido de hidrogênio ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). As SV-LAOs (Snake Venom L-Amino Acid Oxidases) apresentam composição variada em peçonhas de diferentes espécies e são consideradas enzimas multifuncionais. São geralmente homodiméricas, com massas moleculares variando entre 12-150 kDa, e possuem efeitos biológicos bactericidas, antivirais, antitumorais e antiparasitários, comumente atribuídos ao  $\text{H}_2\text{O}_2$  formado. O objetivo deste trabalho foi comparar o efeito antiparasitário em duas espécies do gênero *Leishmania*, ocasionado por duas SV-LAOs botrópicas isoladas de duas espécies diferentes. As SV-LAOs BjussuLAO-II e BmooLAO foram isoladas através dos passos cromatográficos de exclusão molecular em Shephacryl S-100; interação hidrofóbica em Phenyl Sepharose e afinidade em Benzamidina Sepharose. As enzimas purificadas apresentaram alta atividade específica de LAO, com 3481,17 U/mg/min para BjussuLAO-II e 4924,77 U/mg/min para BmooLAO. O alinhamento com a sequência referência ATU85535.1 (SV-LAO de *B. moojeni*), demonstrou identidade de 96.2% para BjussuLAO-II e 93.4% para BmooLAO, além de 91.59% entre BjussuLAO-II e BmooLAO. Análises das modificações pós-traducionais presentes nas duas enzimas exibiram diferentes quantidades de modificações para as duas, sendo para BjussuLAO-II e para BmooLAO. Ademais, a modelagem molecular do sítio de ligação do FAD demonstrou uma região bem conservada na referência ATU85535.1 e nas SV-LAOs estudadas. Os ensaios de citotoxicidade realizados nas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* apresentaram alta citotoxicidade das duas SV-LAOs testadas, mesmo em baixas concentrações. As SV-LAOs estudadas revelaram menor atividade específica de LAO utilizando como substrato o meio LIT completo; mas interessante, apesar da mesma concentração de BjussuLAO-II e BmooLAO produzir quantidade semelhante de  $\text{H}_2\text{O}_2$ , foi observado

diferentes efeitos citotóxicos nos tratamentos dos parasitos. Além disso, as SV-LAAOs deste trabalho expressaram efeitos antiproliferativos e de interferência no potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dos parasitos. Na análise das espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, surpreendentemente a BjuusuLAAO-II aumentou a produção de EROs somente da espécie *L. (L.) amazonensis*, enquanto que a BmooLAAO atuou exclusivamente em *L. (V.) braziliensis*, evidenciando uma certa especificidade das SV-LAAOs estudadas.

Palavras chave: L-aminoácido oxidases, SV-LAAOs, estresse oxidativo, *Leishmania Leishmania amazonensis*, *Leishmania Viannia braziliensis*.

## Abstract

L-amino acid oxidases are oxidoreductases flavoenzymes that use L-amino acids as substrate for stereospecific catalysis in  $\alpha$ -keto acids, releasing ammonia ( $\text{NH}_3$ ) and hydrogen peroxide ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ). SV-LAAOs (Snake Venom L-Amino Acid Oxidases) show a varied composition in venoms of different species and are considered multifunctional enzymes. They are generally homodimeric, with molecular masses ranging from 12-150 kDa, and have bactericidal, antiviral, antitumor and antiparasitic biological effects commonly attributed to the formed  $\text{H}_2\text{O}_2$ . The aim of this study was to compare the antiparasitic effect on two species of the *Leishmania* genus, caused by two isolated botropic SV-LAAOs from two different species. SV-LAAOs BjussuLAAO-II and BmooLAAO were isolated by molecular exclusion chromatographic steps on Shephacryl S-100; hydrophobic interaction in Phenyl Sepharose and affinity in Benzamidine Sepharose. Purified enzymes showed high LAAO specific activity, with 3481.17 U/mg/min for BjussuLAAO-II and 4924.77 U/mg/min for BmooLAAO. Alignment with the reference sequence ATU85535.1 (SV-LAAO of *B. moojeni*) showed 96.2% identity for BjussuLAAO-II and 93.4% for BmooLAAO, and 91.59% between BjussuLAAO-II and BmooLAAO. Analyzes of the post-translational modifications present in the two enzymes showed different amounts of modifications for both, being for BjussuLAAO-II and for BmooLAAO. In addition, the molecular modeling of the FAD binding site demonstrated a well conserved region in reference ATU85535.1 and SV-LAAOs studied. Cytotoxicity assays performed on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* and *Leishmania (Viannia) braziliensis* showed high cytotoxicity of the two SV-LAAOs tested, even at low concentrations. The SV-LAAOs studied showed lower LAAO specific activity using as substrate the complete LIT medium; but interestingly, despite the same concentration of BjussuLAAO-II and BmooLAAO producing similar amount of  $\text{H}_2\text{O}_2$ , different cytotoxic effects were observed in the parasite treatments. In addition, the SV-LAAOs of this work expressed antiproliferative and interference effects on mitochondrial potential ( $\Delta\Psi_m$ ) of parasites. In the

analysis of intracellular reactive oxygen species (ROS), surprisingly, BjussuLAAO-II increased the production of ROS only from *L. (L.) amazonensis*, whereas BmooLAAO acted exclusively on *L. (V.) braziliensis*, showing a certain specificity of the SV-LAAOs studied.

Keywords: L-aminoacid oxidases, SV-LAAOs, oxidative stress, *Leishmania Leishmania amazonensis*, *Leishmania Viannia braziliensis*.



## Lista de Figuras

- Figura 1. Distribuição geográfica da estimativa de envenenamentos e mortes por acidentes ofídicos** (GUTIÉRREZ et al., 2017). ..... 4
- Figura 2. Distribuição mundial da abundância relativa de espécies de serpentes medicamente importantes** (WHO, 2019). ..... 9
- Figura 3. Mecanismo do ciclo catalítico de L-aminoácido oxidases.** (Adaptado de COSTA et al., 2014). ..... 15
- Figura 4. Epidemiologia mundial de leishmanioses tegumentar e visceral** (Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015). ..... 19
- Figura 5. Ciclo de vida e infecção de parasitas do gênero Leishmania.** Formas promastigota presentes na fêmea flebotomíneo (1) são fagocitados por células fagocíticas mononucleares (2), onde se diferenciam em amastigotas (3) que se multiplicam e infectam outras células sistema mononuclear fagocitário (4). Flebotomíneos são infectados durante o repasto sanguíneo com formas amastigotas (5), que são liberadas dentro do inseto (6). Amastigotas transformam-se em promastigotas metacíclicas no intestino (7) e migram para o probóscide do flebotomíneo (8) (CDC, 2019). ..... 21
- Figura 6. Processo de purificação da enzima BjussuLAAO-II.** Um total de 125 mg de peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* foi utilizado inicialmente. **A:** Perfil cromatográfico da exclusão molecular Sephacryl S-100. **B:** Perfil cromatográfico da coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose 6 FastFlow. **C:** Perfil cromatográfico da purificação por afinidade em BenzamidinaSepharose 4 FastFlow. **D:** Gel de eletroforese após passos de purificação mostrando a BjussuLAAO-II purificada. .... 32
- Figura 7. Processo de purificação da enzima BmooLAAO.** Um total de 125 mg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi utilizado inicialmente **A:** Perfil cromatográfico da exclusão molecular Sephacryl S-100. **B:** Perfil cromatográfico da coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose 6 FastFlow. **C:** Perfil cromatográfico da purificação por afinidade em BenzamidinaSepharose 4 FastFlow. **D:** Gel de eletroforese após passos de purificação mostrando a BmooLAAO purificada. .... 33

**Figura 8. Atividade específica de LAAO das enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO purificadas.** Foram incubados 2 µg de cada enzima com o aminoácido L-leucina durante 30 minutos, e após a paragem da reação a absorbância de cada amostra foi lida em espectrofotômetro à 490 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,001$  (\*\*\*).....34

**Figura 9. Sequências obtidas para as enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO por espectrometria de massas.** A marcação em amarelo indica o começo do N-terminal, sem o peptídeo sinal, e \* indica os gaps que não foram sequenciados. ....35

**Figura 10. Alinhamento das sequências de BjussuLao-II e BmooLao-I comparadas com o depósito ATU8535.1.** As caixas pretas representam os aminoácidos conservados. Os resíduos em preto são conservados em pelo menos duas sequências, enquanto resíduos não conservados são representados em cinza. O alinhamento foi realizado utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988). ....36

**Figura 11. Sequência de novo das SV-LAAOs purificadas usando como referência a sequência ATU85535.1 de *B. moojeni*.** As figuras completas estão no Apêndice. **A:** BjussuLAAO-II apresentou 94 modificações pós-traducionais. **B:** BmooLAAO apresentou 62 modificações pós-traducionais. ....37

**Figura 12. Modelo da estrutura quaternária gerado por homologia para ATU85535.1 de *Bothrops moojeni*.** Em rosa e roxo estão demonstradas as duas subunidades da SV-LAAO referência. ....39

**Figura 13. Principais aminoácidos envolvidos no bolsão de interação do cofator FAD das SV-LAAOs modelo *B. Jararacussu* e referência ATU85535.** 1: Gly58, Ala59, Gly60, Met61, Ser62, Leu80, Glu81, Ala82, Ser83, Arg85, Ala86, Gly87, Gly88, Arg89, Val90, Gly105, Pro106, Met107, Arg108, Leu109, Leu275, Cys311, Thr312, Tyr443, Trp438, Gly447, Gly482, Trp483, Ile484, Thr487, Glu475, Gly474. ....39

**Figura 14. Efeito citotóxico das SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO sobre os parasitos das espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Foi realizada uma diluição seriada a partir de 12,5 µg/mL para cada enzima nas duas espécies, e após 24h de tratamento foi incubado o reagente MTT para metabolização por 3h. Posteriormente foi adicionado SDS 10% overnight e a leitura da

absorbância foi feita no dia seguinte à 570 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). **A:** *L. (L.) amazonensis* tratada com BjussuLAAO-II. **B:** *L. (L.) amazonensis* tratada com BmooLAAO. **C:** *L. (V.) braziliensis* tratada com BjussuLAAO-II. **D:** *L. (V.) braziliensis* tratada com BmooLAAO. ....41

**Figura 15. Efeito citotóxico das SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO na presença de catalase sobre os parasitos das espécies *Leishmania Leishmania amazonensis* e *Leishmania Viannia braziliensis*.** Foi realizada uma diluição seriada a partir de 12,5 µg/mL para cada enzima nas duas espécies, e logo em seguida foram adicionados os parasitos com catalase. Após 24h de tratamento foi incubado o reagente MTT para metabolização por 3h, e posteriormente foi adicionado SDS 10% overnight. A leitura da absorbância foi feita no dia seguinte à 570 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes. **A:** *L. (L.) a* tratada com BjussuLAAO-II e catalase. **B:** *L. (L.) a* tratada com BmooLAAO e catalase. **C:** *L. (V.) b* tratada com BjussuLAAO-II e catalase. **D:** *L. (V.) b* tratada com BmooLAAO e catalase. ....42

**Figura 16. Atividade específica de LAAO com as concentrações selecionadas no MTT utilizando L-leucina e meio LIT completo como substrato.** As concentrações de 0,195, 0,391, 0,781, 1,563 e 6,25 µg/mL foram incubadas com os substratos L-leucina e meio LIT completo durante 30 minutos. Após a paragem da reação as amostras foram lidas em espectrofotômetro à 490 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,1$  (\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Concentrações citotóxicas de BjussuLAAO-II incubadas com o aminoácido e com meio LIT. **B:** Concentrações citotóxicas de BmooLAAO incubadas com o aminoácido e com meio. **C:** comparação da atividade de LAAO entre BjussuLAAO-II e BmooLAAO com L-leucina e meio LIT completo. ....45

**Figura 17. Efeito antiproliferativo produzido pelas SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.** Parasitos das duas espécies foram tratados com diferentes concentrações das enzimas SV-LAAOs. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos de incubação, 6, 12, 24 e 48h, e parasitos foram contatos na câmara de Neubauer. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,1$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Parasitos *L. (L.) amazonensis* tratados com concentrações de 0,195 e 1,563 g/mL de BjussuLAAO-II, e 1,563 e 6,25 µg/mL de BmooLAAO. **B:** Parasitos *L. (V.) braziliensis* tratados com concentrações de 0,391 e 1,563 g/mL de BjussuLAAO-II, e 1,563 e 6,25 µg/mL de BmooLAAO. ....47

**Figura 18. Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) induzida pelas SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO.** Parasitos das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram tratados com as enzimas SV-LAAOs por 24h e posteriormente incubados com o corante Rh 123. A análise da fluorescência foi realizada através do citômetro de fluxo com pelo menos 10 mil eventos. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,1$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Tratamento com as concentrações 0,195  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II e 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO na espécie *L. (L.) amazonensis*. **B:** Tratamento com a concentração 0,391  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II na espécie *L. (V.) braziliensis*. **C:** Tratamento com a concentração 0,781  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO na espécie *L. (V.) braziliensis*. .....49

**Figura 19. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por parasitos da espécie *L. (L.) amazonensis*, induzida pelas SV-LAAOs.** Promastigotas foram incubados com as enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO por 6h e posteriormente incubados com a sonda CM-H2DCFDA. A análise da fluorescência foi realizada através do citômetro de fluxo com pelo menos 10 mil eventos. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Gráfico das medianas de fluorescência dos não tratado, *L. (L.) amazonensis* tratada com 0,195  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II e com 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO. **B:** Gráfico de quadrante do controle PI. **C:** Gráfico de quadrante do controle EROs. **D:** Gráfico de quadrante do não tratado. **E:** Gráfico de quadrante do tratamento com 0,195  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II. **F:** Gráfico de quadrante do tratamento com 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO. ....52

**Figura 20. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis*, induzida pelas SV-LAAOs.** Promastigotas foram incubados com as enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO por 6h e posteriormente incubados com a sonda CM-H2DCFDA. A análise da fluorescência foi realizada através do citômetro de fluxo com pelo menos 10 mil eventos. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Gráfico das medianas de fluorescência dos não tratado, *L. (V.) braziliensis* tratada com 0,391  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II e com 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO. **B:** Gráfico de quadrante do controle PI. **C:** Gráfico de quadrante do controle EROs. **D:** Gráfico de quadrante do não tratado. **E:** Gráfico de quadrante do tratamento com 0,391  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II. **F:** Gráfico de quadrante do tratamento com 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO. ....53

## Lista de Tabelas

<b>Tabela 1. Medicamentos no mercado e em testes clínicos oriundos de peçonhas de serpentes. Dados de até 2016 (CHAN et al., 2016).</b> .....	10
<b>Tabela 2. Alguns transcriptomas do gênero <i>Bothrops</i> (Adaptado de BRAHMA et al., 2015).</b> .....	12
<b>Tabela 3. Sequência primária da SV-LAAO utilizada como <i>input</i> para modelagem molecular por homologia (AMORIM et al., 2017).</b> .....	38
<b>Tabela 4. Concentrações selecionadas a partir dos ensaios de MTT sobre os parasitos.para as duas SV-LAAOs botrópicas</b> .....	43

## Lista de abreviaturas

Asp 49 – Aminoácido aspartato na posição 49

B.O.D. – Biological oxygen demand

BjussuLAAO-II – L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de *Bothrops jararacussu*

BmoolLAAO – L-aminoácido oxidase isolada da peçonha de *Bothrops moojeni*

CO<sub>2</sub> – Gás Carbônico

EDTA – Ácido etilenodiaminotetraacético

Fe<sup>+</sup> – Íon Ferro

FPLC – Fast Protein Liquid Chromatography

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> – Peróxido de Hidrogênio

HCl – Ácido Clorídrico

K<sup>+</sup> – Íon Potássio

kDa – QuiloDalton

*L. (L.) a* – *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

*L. (V.) b* – *Leishmania (Viannia) braziliensis*

LAAOs - L-aminoácido oxidases

LIT – Liver Infusion Triptose

Lys 49 – Aminoácido lisina na posição 49

mg – Miligrama

Mg<sup>2+</sup> – Íon Magnésio

Min – Minutos

mM – Milimolar

Mn<sup>2+</sup> – Íon Manganês

MTT – 3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl blue tetrazole

Na<sup>+</sup> – Íon Sódio

NaCl – Cloreto de Sódio

nm – Nanômetro

PBS – Phosphate Buffered Saline

PI – Iodeto de Propídeo

pI – Ponto Isoelétrico

PLA<sub>2</sub> – Fosfolipases A<sub>2</sub>

PMSF – Phenylmethylsulfonylfluoride

RER – Retículo Endoplasmático Rugoso

Rh 123 – Rodamina 123

ROS – Reactive oxygen species

SDS – *Sodium dodecyl sulfate*

SFB – Soro Fetal Bovino

SV-LAAOs – Snake Venom L-Amino Acid Oxidases

SVMPs – Snake Venom Metaloproteinases

SVSPs – Snake Venom Serine proteases

Tris-HCL – Tris(hydroxymethyl)aminomethanehydrochloride

U – Unidade de atividade

WHO – World Health Organization

Zn<sup>2+</sup> – Íon Zinco

# 1. INTRODUÇÃO

## 1.1. Aspectos gerais sobre serpentes peçonhentas

Em herpetologia – área da zoologia responsável pelo estudo de anfíbios e répteis (ZUG; VITT; CALDWELL, 2001) – a classe Reptilia conta com mais de 10 mil espécies (THE REPTILE DATABASE, 2016) distribuídas em diferentes grupos dessa classe, como: a superordem Archosauria que engloba as ordens Crocodylia e Aves; a ordem Testudines, das tartarugas; e a superordem Lepidosauria, a qual abrange as ordens Sphenodontia (tuatara) e Squamata (lagartos, anfisbênias e serpentes) (VITT; CALDWELL, 2014). Devido, à grande heterogeneidade de répteis vivos, existem 3.763 espécies de serpentes dentro da subordem Ophidia (THE REPTILE DATABASE, 2019), e em geral, podem ser consideradas como um grupo bem sucedido dentro do subfilo dos Vertebratas, apresentando padrões altamente conservados (CALVETE et al., 2009; LEE; SCANLON, 2002). Espécies antigas compartilham características com fósseis, serpentes modernas, e também possuem alguns traços em comum com lagartos (CALDWELL et al., 2015).

A dieta das serpentes é bastante variada incluindo, caracóis, galinhas, camundongos, sapos, peixes, lagartos, ratos, e até mesmo outras serpentes. Geralmente podem ser encontradas em diversas regiões do mundo, principalmente em regiões temperadas e tropicais, por conta da necessidade que esses animais possuem, de calor externo, para conseguirem exercer a termorregulação (GOMES; BRANDEBURGO, 2006; GUTIÉRREZ et al., 2017). Estes animais são um dos poucos organismos vivos que despertam emoção no ser humano, estando relacionados com crenças populares desde tempos pré-históricos. Estes podem provocar uma resposta positiva ou negativa quando se ouve sons de assobio, chocalhar ou até mesmo quando é feita uma mera menção da palavra “cobra”, e este fascínio intenso provavelmente decorre do efeito mortal de seus “venenos”(GOMES; BRANDEBURGO, 2006; KANG et al., 2011).

As serpentes peçonhentas estão amplamente distribuídas pelo mundo e as espécies que produzem toxinas, podem ser encontradas em



quatro famílias, sendo elas, Viperidae, Elapidae, Atractaspididae e Colubridae, ressaltando que nesta última, somente algumas espécies possuem glândulas e peçonha (FOX; SERRANO, 2008; JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO et al., 2016), além de um aparato inoculador bem primitivo (CARDOSO et al., 2003; JACKSON, 2007). Podem apresentar dentições diferentes de acordo com as famílias, podendo ser classificadas em solenóglifas (Viperidae e Atractaspididae) com uma maxila encurtada e presas móveis; proteróglifas (Elapidae) em que as presas são fixas, frontais e tubulares; e opistóglifas (algumas espécies da família Colubridae) que podem ter dentes posteriores alargados ou sulcados (JACKSON, 2003).

Na evolução das serpentes, os compostos biologicamente ativos (toxinas) representam um aperfeiçoamento adaptativo decorrente da transição de um mecanismo de constrição (característica mecânica), para um produto químico (peçonha) produzido e armazenado em glândulas, e ainda, secretado por aparatos especializados (CALVETE et al., 2009; CARDOSO et al., 2003; GOMES; BRANDEBURGO, 2006; KOCHVA, 1987; QUEIROZ, 2010). As serpentes usam as peçonhas como armas ofensivas para paralisar e imobilizar presas (função primária), como ferramentas defensivas contra predadores (função secundária) e como auxílio na digestão (KANG et al., 2011).

As peçonhas das serpentes são produzidas por glândulas secretoras especializadas, localizadas acima do maxilar superior, e são desenvolvidas para realizarem a biossíntese das toxinas. A maioria das proteínas são sintetizadas no citoplasma das células secretórias presentes na glândula, transferidas para o retículo endoplasmático rugoso (RER), subsequentemente direcionadas para o complexo de Golgi e transportadas por grânulos secretórios até o lúmen da glândula. De acordo com estudos de cDNA, todas as proteínas das peçonhas têm uma sequência sinal que provavelmente é responsável pelo direcionamento da proteína nascente para o retículo endoplasmático, e durante o transporte essa sequência é removida. Ao que tudo indica, como a maioria das proteínas secretoras, é no RER que adquirem sua conformação tridimensional, glicosilações, ligações dissulfeto e até multimerizações (FOX; SERRANO, 2008).

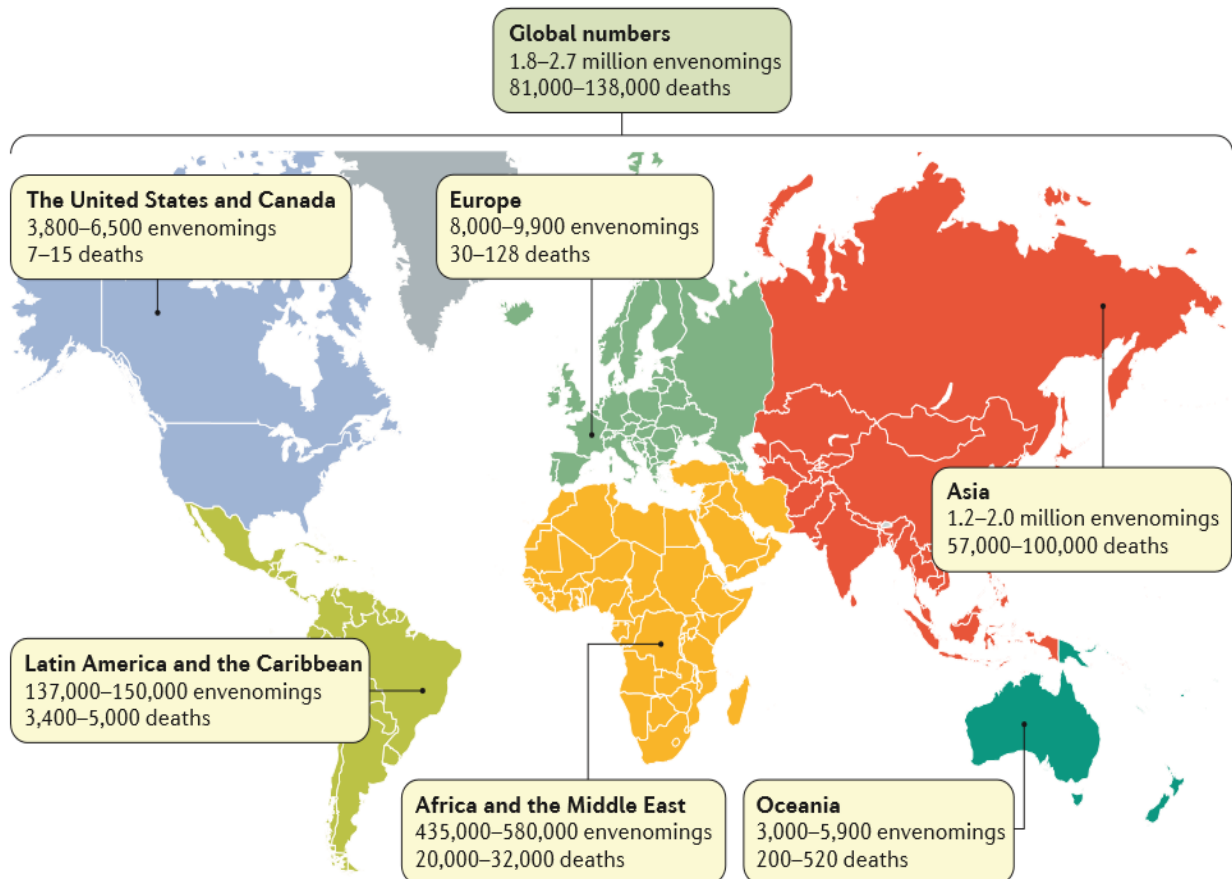
A composição das toxinas pode variar de acordo com habitat, clima, idade, localização geográfica, espécies e alimentação das serpentes; todavia, são compostas por uma gama de componentes biológicos que conseguem desencadear diferentes tipos de efeitos fisiopatológicos. De forma geral, podem ser divididas em peçonhas hemotóxicas, citotóxicas e neurotóxicas, com ações sobre os sistemas cardiovascular e sanguíneo; alvos celulares específicos ou tecidos musculares; e sobre o sistema nervoso, respectivamente (CALVETE et al., 2009; VYAS et al., 2013).

Acidentes ofídicos são quadros de envenenamento decorrentes da inoculação da peçonha após a mordida (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018), ou ainda, podem acontecer quando as toxinas presentes nas glândulas são lançadas pelas serpentes e acabam entrando em contato com olhos ou mucosas (WHO, 2019). É sabido que nem toda mordida acarreta intoxicação, pois, além de existir espécies que possuem dificuldade na injeção de toxinas - por conta das presas localizadas na parte de trás da boca - e animais com ausência de aparato inoculador (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018); pode acontecer a “mordida seca”, quando a serpente confere o bote sem inocular peçonha, logo, as vítimas não apresentam características locais ou sistêmicas de envenenamento (NAIK, 2017).

Informações disponibilizadas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) certificam que casos de mordidas por serpentes peçonhentas ainda é um grande problema de saúde pública negligenciado em vários países tropicais e subtropicais que, conseqüentemente, resulta em cerca de 5.4 milhões de acidentes anualmente. Aproximadamente 2,7 milhões de quadros de envenenamento são provocados (**Figura 1**), causando mais 81 mil mortes além de inúmeras amputações e sequelas, até três vezes mais numerosas que os óbitos, por ano (CHIPPAUX, 2017; WHO, 2019)

Contudo, estes dados fornecidos não correspondem completamente à realidade, visto que, muitas vítimas não relatam o ocorrido e nem frequentam centros de saúde ou hospitais. A maioria dos casos de acidentes ofídicos ocorrem na África, Ásia e América Latina (**Figura 1**), pois o envenenamento afeta majoritariamente pessoas em comunidades rurais mais pobres, geralmente localizadas em países de baixa e média renda. E ainda, a maior quantidade de mordidas ocorre em países onde os

sistemas de saúde são fracos e os recursos médicos mais escassos. Somente na Índia, estima-se quase 47 mil casos fatais; em Bangladesh, ao menos 6041 mortes; e na África Subsaariana, tem uma estimativa entre 7 e 20 mil mortes (CHIPPAUX, 2017; WHO, 2019).



**Figura 1. Distribuição geográfica da estimativa de envenenamentos e mortes por acidentes ofídicos (GUTIÉRREZ et al., 2017).**

Segundo o Ministério do Meio Ambiente, a grande variedade de flora e fauna garantem que o Brasil seja a nação de maior biodiversidade do mundo, abrigando mais de 20% de todas as espécies do planeta. Atualmente, são contabilizadas 773 espécies de répteis da ordem Squamata, sendo 412 espécies de serpentes (THE REPTILE DATABASE, 2019), das quais 40% são endêmicas no território brasileiro (COSTA; BÉRNILS, 2018), causando aproximadamente 29 mil casos de

envenenamentos anualmente, com média de 125 mortes (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Em 2017, foram contabilizados 106 óbitos, e em 2018 mais de 82 mil doses de soro antiofídico foram distribuídas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018). Segundo o Ministério da Saúde aumentaram o número de notificações sobre a incidência de acidentes ofídicos no Brasil, e por esse motivo, o país foi incluído na Lista de Notificação Compulsória ([http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004\\_03\\_10\\_2017.html](http://bvsms.saude.gov.br/bvs/saudelegis/gm/2017/prc0004_03_10_2017.html)) que contem notificações de todos os casos reportados ao governo federal, logo após confirmação de envenenamento.

No território brasileiro, encontram-se somente duas famílias de serpentes peçonhentas, a Elapidae e Viperidae (CARDOSO et al., 2003; COSTA; BERNILS, 2018), que dividem os acidentes em quatro tipos (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2018):

- I. acidentes botrópicos: ocasionados por serpentes dos gêneros *Bothrops* e *Bothrocophias* (jararaca, jararacuçu, urutu, caiçara, comboia);
- II. acidentes crotálicos: causados por espécies do gênero *Crotalus* (cascavel);
- III. acidentes laquéticos: provocados por mordidas de espécies do gênero *Lachesis* (surucucu-pico-de-jaca);
- IV. acidente elapídico: decorrente do acidente com serpentes do gênero *Micrurus* e *Leptomicrurus* (coral verdadeira).

As manifestações clínicas dos quadros de envenenamento podem variar de acordo com a espécie da serpente que disfare a mordida, e há um amplo espectro de efeitos fisiopatológicos induzidos por peçonhas, devido ao diverso arsenal descrito em sua composição (CALVETE, 2011).

## **1.2. Composição das peçonhas de serpentes**

As peçonhas evoluíram para misturas complexas de proteínas e peptídeos farmacologicamente ativos com efeitos potentes, letais e debilitantes (KANG et al., 2011), tanto para presas quanto para vítimas de acidentes ofídicos. A ação tóxica pode aparecer mais rápida ou

demoradamente e é decorrente da variedade de substâncias bioativas presentes nas glândulas e à toxicocinética – velocidade de absorção e permeabilidade das toxinas no organismo (CUNHA & MARTINS, 2012).

Os componentes presentes nas peçonhas (proteínas, peptídeos, lipídeos, polissacarídeos e substâncias inorgânicas) são complexas misturas, nas quais polipeptídeos e proteínas correspondem mais de 90% do peso seco da peçonha. Além disso, é possível encontrar isoformas que podem apresentar características estruturais, funcionais e bioquímicas distintas; todavia, como as glândulas são homólogas, algumas famílias de toxinas costumam ser onipresentes nos diferentes gêneros de serpentes peçonhentas (CALVETE, 2011; CHAN et al., 2016; KANG et al., 2011; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006; TASOULIS; ISBISTER, 2017).

É provável que as primeiras substâncias ativas foram enzimas que certamente possuíam alguma função digestiva (KOCHVA, 1987) e contribuía para enfraquecer a presa, tornando mais fácil e seguro o manuseio (KOCHVA, 1987). As enzimas mais comumente encontradas nas peçonhas ofídicas são fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>), hialuronidases, L-aminoácido oxidases (SV-LAAOs), metaloproteases (SVMPs) e serinoproteases (SVSPs); contudo, geralmente outras substâncias não enzimáticas também podem ser encontradas nas peçonhas, como os componentes inorgânicos K<sup>+</sup>, Mg<sup>2+</sup>, Na<sup>+</sup>, Fe<sup>+</sup>, Mn<sup>2+</sup> e Zn<sup>2+</sup>, que podem ou não atuar como cofatores, desintegrinas, inibidores, peptídeos bioativos, lectinas tipo C e fatores de crescimento (KANG et al., 2011; MATSUI; FUJIMURA; TITANI, 2000; RAMOS; SELISTRE-DE-ARAUJO, 2006).

Em relação aos componentes enzimáticos, as peçonhas de serpentes são ricas fontes de fosfolipases A<sub>2</sub> secretórias (sPLA<sub>2</sub>), enzimas dependentes de cálcio que catalisam a hidrólise da ligação 2-acil éster de 2-sn-fosfolipídeos, liberando lisofosfolipídeos e ácidos graxos livres (KETELHUT et al., 2003; VYAS et al., 2013). Estas apresentam baixa massa molecular (entre 13 e 18 kDa) e múltiplas ligações dissulfeto, podendo chegar em até 8, estabilizando sua estrutura. Além disso, possuem uma histidina no centro ativo e pertencem aos grupos I e II da classificação das fosfolipases (SCHALOSKE; DENNIS, 2006; WARD et al., 2001).

As fosfolipases A<sub>2</sub> podem ser subdivididas em Asp49, enzimas com alta atividade catalítica, e em Lys49 (e homólogos), desprovidas de atividade hidrolítica (ZULIANI; GUTIÉRREZ; TEIXEIRA, 2018). As PLA<sub>2</sub>s das serpentes possuem importante papel na digestão das presas, mas ao mesmo tempo, interferem nos processos fisiológicos normais relacionados com edema, hipotensão e agregação plaquetária; e ainda, apresentam altos graus de miotoxicidade, cardiotoxicidade e neurotoxicidade (DE ALVARENGA et al., 2011; GUIMARÃES et al., 2014; RODRIGUES et al., 2015). Devido à importância dessas moléculas, as foslipases A<sub>2</sub> são bem exploradas como promissores agentes terapêuticos.

As hialuronidases são endoglicosidases que degradam principalmente o ácido hialurônico (AH, ou hialuronan), e que podem ter atividade sobre condroitina, sulfato de condroitina (CS) e, até certo ponto, dermatan sulfato (DS) (GREMSKI et al., 2010; KEMPARAJU; GIRISH, 2006). Em peçonhas animais, essas enzimas têm sido descritas como “fatores de espalhamento” devido à sua capacidade de degradar componentes da matriz extracelular e aumentar a difusão das outras toxinas em tecidos adjacentes ao local da inoculação (KEMPARAJU; GIRISH, 2006). A ação dessas enzimas sobre o hialuronan contribuem para uma severa destruição tecidual no local da picada e para um colapso sistêmico, quando adentram à corrente sanguínea (HARRISON et al., 2007). Entretanto, apesar da importância dessas moléculas para a toxicidade das peçonhas, essa classe tem sido menos explorada e estudada, quando comparada com as demais enzimas (KEMPARAJU; GIRISH, 2006).

As metaloproteases (SVMPs) são enzimas distribuídas amplamente nas peçonhas ofídicas que contribuem para a sua alta toxicidade (MARKLAND; SWENSON, 2013). Estas possuem uma diversidade estrutural bem conhecida (BJARNASON; FOX, 1995; FOX; SERRANO, 2005), sendo sintetizadas como pró-enzimas com pré e pró domínios, responsáveis pelo direcionamento das proteínas nascentes para o retículo endoplasmático e pela manutenção da latência da enzima antes da secreção, respectivamente (GOMIS-RÜTH, 2003).

As SVMPs são dependentes de zinco para sua função catalítica e fazem parte da família M12 de metaloproteinases, categorizadas de acordo com a presença ou não, de domínios não catalíticos, sendo subdivididas em PI (somente domínio catalítico), PII (domínios catalítico e desintegrina) e PIII (domínios catalítico, semelhante à desintegrina e ricos em cisteína) (FOX; SERRANO, 2008). A eficácia das SVMPs é devida em grande parte à sua diversidade funcional, visando proteínas fisiológicas importantes ou receptores em diferentes tecidos e na via de coagulação (MOURA-DA-SILVA et al., 2016).

O efeito mais evidente das SVMPs é a hemorragia, como resultado de uma ruptura combinada da integridade dos vasos capilares e do comprometimento do sistema de coagulação sanguínea, resultando no consumo de fatores da via de coagulação (MOURA-DA-SILVA; BUTERA; TANJONI, 2007).

As serinoproteases de peçonhas de serpentes (SVSPs) são glicoproteínas, geralmente de cadeia única, com uma região catalítica bem conservada composta por Ser195, His57 e Asp102. Possuem uma grande diversidade de substratos e são capazes de apresentar uma ação sistêmica no organismo, principalmente sobre a via de coagulação, que levam ao desequilíbrio da hemostasia (SERRANO, 2013; SERRANO; MAROUN, 2005).

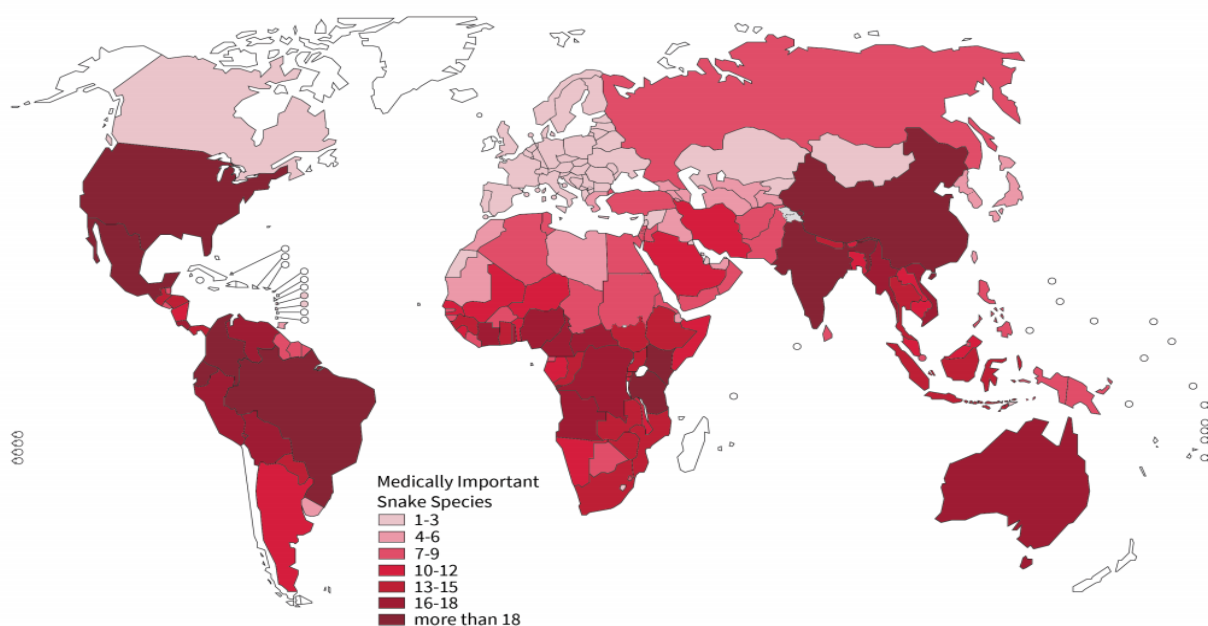
As SVSPs são funcionalmente semelhantes às enzimas do sistema hemostático e conseguem clivar um ou mais pontos específicos da via de coagulação, dos sistemas fibrinolíticos e calicreína-cinina, além de interferir na integridade vascular, hipotensão e função plaquetária (SAJEVIC; LEONARDI; KRIŽAJ, 2011; ZELANIS et al., 2015).

As enzimas “thrombin-like” (um tipo de SVSPs) possuem ação semelhante à trombina porque são capazes de coagular o sangue somente *in vitro*, porém *in vivo* não ativam o fator XIII, responsável pelas ligações cruzadas entre monômeros de fibrina (MANJUNATHA KINI, 2003). As SVSPs, em geral, são de interesse médico principalmente para prevenção ou tratamento de trombozes (VU et al., 2013).

As SV-LAOs (Snake Venom L-Amino Acid Oxidases), juntamente com as enzimas descritas anteriormente, são as principais classes

estudadas quando se trata de peçonhas ofídicas. Contudo, esse grupo em específico (LAAOs e SV-LAAOs) será abordado no item 1.4.

Várias moléculas presentes nas peçonhas ofídicas de espécies do mundo inteiro (**Figura 2**) têm sido exploradas como ferramentas de diagnósticos e para fins terapêuticos. Além disso, algumas já são utilizadas como medicamentos ou estão em testes clínicos para aprovação (**Tabela 1**), por conta do interesse farmacológico e potencial biotecnológico das peçonhas e, muitas vezes, pela especificidade de alguns componentes presentes nessas toxinas (CHAN et al., 2016).



**Figura 2. Distribuição mundial da abundância relativa de espécies de serpentes medicamente importantes (WHO, 2019).**



**Tabela 1. Medicamentos no mercado e em testes clínicos oriundos de peçonhas de serpentes** Dados de até 2016 (CHAN et al., 2016).

Drugs	Source	Applications	Status
Captopril	Derivatives of bradykinin-potentiating peptide from <i>Bothrops jaracusa</i>	Hypertension treatment	FDA approved
Eptifibatide	Derivatives of disintegrin from <i>Sistrurus miliaris barbouri</i>	Antiplatelet drug	FDA approved
Tirofiban	Derivatives of disintegrin from <i>Echis carinatus</i>	Antiplatelet drug	FDA approved
Batroxobin	Serine protease from <i>Bothrops atrox</i> and <i>B. moojeni</i>	Defibrinogenating agent	FDA not approved but marketed in some countries outside the USA
Hemocoagulase	Thromboplastin-like and thrombin-like enzymes from <i>B. atrox</i>	Hemorrhage treatment	FDA not approved but marketed in some countries outside the USA
Ximelagatran	Peptides from cobra	Anticoagulant	Had been approved in some countries but withdrawn from the market
Ancred	Enzymes from <i>Agkistrodon rhodostoma</i>	Defibrinogenating agent	Had been approved in some countries but withdrawn from the market; currently under phase III clinical study
Dendroaspis-NP	Natriuretic peptide from <i>Dendroaspis angusticeps</i>	Congestive cardiac failure treatment	Under phase II clinical study
$\alpha$ -Cobrotoxin/ $\alpha$ -cobratoxin	Neurotoxins from <i>Naja nivea</i> and <i>Naja kaouthia</i> , respectively	Analgesics	Under human clinical studies in China

### 1.3. Características principais de serpentes peçonhentas do gênero *Bothrops*

O gênero *Bothrops* pertence à família Viperidae, subfamília Crotalinae, e apresenta uma grande diversidade de morfologia, características ecológicas e espécies. Compreende pelo menos 50 espécies, que podem ser encontradas em diferentes habitats como florestas tropicais, subtropicais, e, regiões áridas, semiáridas, e com altitudes maiores que 3 mil metros acima do nível do mar (CARRASCO et al., 2012, 2016).

As espécies desse gênero são as principais causadoras de acidentes ofídicos na América do Sul, sendo responsáveis por até 85% dos envenenamentos que ocorrem no Brasil (QUEIROZ et al., 2008; SARTIM et al., 2016). No território brasileiro existem mais de 20 espécies (BELLO et al., 2006; COSTA; BÉRNILS, 2018) comumente encontradas em áreas

litorâneas, úmidas, agrícolas, periurbanas, cerrados, beira de rios e igarapés (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019; VALLE & BRITES, 2008), e por conta disso, os envenenamentos no país são, na maioria das vezes, considerados acidentes de trabalho por ocorrerem com pessoas envolvidas em atividades no campo, florestas e águas (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2019).

Além disso, essas serpentes são capazes de conferir botes sem produção de sons, o que pode contribuir para a grande quantidade de casos (SANTANA; SUCHARA, 2015), entretanto, apesar da numerosa incidência de acidentes ofídicos, o Brasil está entre os países que possuem tratamento, produzindo soros antiofídicos (WHO, 2019).

As peçonhas botrópicas apresentam três ações principais: proteolítica ou necrótica, coagulante e hemorrágica; podendo ocasionar edema inflamatório, ativação da via de coagulação para formação do coágulo e depleção de fatores do sistema hemostático, respectivamente (OLIVEIRA et al., 2010). Após uma mordida, há uma pequena extensão de sangramento no local de inoculação da peçonha, podendo apresentar dor, edema, vermelhidão, hematomas; e, com menos frequência, pode haver sangramento persistente no local. Além disso, dor e contusões na região podem ser leves no início, mas se agravarem e serem mais pronunciadas no dia seguinte. Nas primeiras 24 horas, a extensão do edema aumenta podendo envolver toda a extremidade afetada e áreas próximas; podem aparecer bolhas hemorrágicas quadros de hemorragia (SANT'ANA MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2015).

Os envenenamentos por este gênero possuem efeitos locais e sistêmicos proeminentes na vítima como hemorragia, coagulopatias, insuficiência renal, necrose, síndrome do compartimento e infecções, que podem ocasionar uma incapacidade permanente (BRAUD, 2000; GUTIÉRREZ, 2000; SANT'ANA MALAQUE; GUTIÉRREZ, 2015; WHITE, 2005). Estes efeitos característicos, provocados por peçonhas botrópicas, são consequência do sinergismo e ação multifatorial comumente observadas em toxinas no geral, e infelizmente, o comportamento desses vários fatores ainda não é bem compreendido (MAMEDE et al., 2016).

A incidência de mordidas por *Bothrops* pode estar relacionada com idade e dimorfismo sexual das serpentes, e já foi relatado que fêmeas e juvenis são responsáveis pela maioria dos acidentes ofídicos (NICOLETI et al., 2010). A espécie *Bothrops jararaca* é a mais bem estudada, e de acordo com a literatura, a composição de sua peçonha altera conforme alimentação, idade, dimorfismo sexual e variabilidades intraespecífica, geográfica e ontogênica (AMORIM et al., 2018).

Para ajudar na compreensão do processo de envenenamento e da composição da peçonha, vários estudos de transcriptoma de diferentes espécies botrópicas, estão descritos na literatura (**Tabela 2**). Além das informações descritas por Brahma et al., (2015), Amorim et al., (2017) realizou o estudo transcriptômico de *Bothrops moojeni* por meio da plataforma Illumina.

**Tabela 2. Alguns transcriptomas do gênero *Bothrops*** (Adaptado de BRAHMA et al., 2015).

<b>Family and Species</b>	<b>Platform</b>	<b>Reference</b>
<i>Bothrops alternatus</i>	cDNA library	(Cardoso et al., 2010)
<i>Bothrops asper</i>	454	(Durban et al., 2011)
<i>Bothrops atrox</i>	cDNA library	(Neiva et al., 2009)
<i>Bothrops insularis</i>	cDNA library	(Junqueira-de-Azevedo and Ho, 2002; Valente et al., 2009)
<i>Bothrops jararaca</i>	cDNA library	(Cidade et al., 2006; Zelanis et al., 2012)
<i>Bothropoides (=Bothrops) pauloensis</i>	cDNA library	(Rodrigues et al., 2012)
<i>Bothrops jararacussu</i>	cDNA library	(Kashima et al., 2004)

### 1.3.1. Peçonha de *Bothrops jararacussu*

Serpentes da espécie *Bothrops jararacussu* podem chegar a até 2,2 metros de comprimento (MILANI JUNIOR, 1997), além de produzir e injetar a maior quantidade de peçonha entre as serpentes brasileiras (CORREA-

NETTO et al., 2010). A peçonha dessa espécie geralmente produz um efeito local intenso e miotóxico, e também pode ocasionar quadros de mioglobinúria e insuficiência renal aguda devido às moléculas encontradas na sua peçonha (BARBOSA et al., 2009; MILANI JUNIOR, 1997).

Kashima et al. (2004) realizaram o estudo transcriptômico da glândula de *Bothrops jararacussu*, analisando 549 clones ESTs (expressed sequence tags), dos quais 340 eram similares com outros genes de serpente previamente isolados. Os clones majoritariamente encontrados foram ESTs codificantes de fosfolipases A<sub>2</sub> (57,9%) e metaloproteases PI e PII (25,9%); enquanto que as demais classes, serinoproteases e LAAOs correspondiam a 2,3% e 1,5%, respectivamente.

Correa et al (2010) comprovou por estudos de proteoma a abundância de fosfolipase A<sub>2</sub>, metaloproteases, lectinas, serinoproteases, LAAOs e proteínas secretoras ricas em cisteína na peçonha de *B. jararacussu*, e demonstrou que as SV-LAAOs foram agrupadas em três grupos de acordo com o ponto isoelétrico (pI) e a massa molecular: (1) duas LAAOs com pI = 4.9 e massas entre 65 e 68 kDa; (2) quatro LAAOs com pI e massas entre 6.3 - 6.5 e 62 - 65, respectivamente; (3) 1 LAAO com pI = 5.9 e massa de 47 kDa.

### **1.3.2. Peçonha da *Bothrops moojeni***

A espécie *Bothrops moojeni* é uma serpente que exibe um comportamento bastante agressivo, sendo responsável por grande parte dos acidentes ofídicos na região sudeste do Brasil. A peçonha desta espécie ocasiona quadros de edema no local da picada, e também mionecrose. Geralmente, esses efeitos são ocasionados pelos componentes encontrados na peçonha destes animais (MAMEDE et al., 2016).

O estudo do transcriptoma de *B. moojeni* realizado por Amorim et al., (2017) demonstrou a presença de componentes chamados de “non-venom-proteins” e “venom components”. Este último representa 2,65% de todos os contigs encontrados, perfazendo 20 classes diferentes de moléculas, em um total de 1574 contigs (conjunto de segmentos de DNA sobrepostos que

juntos representam uma região consenso do DNA). A predominância foi de metaloproteases (46,63%) e serinoproteases (26,18%), além de apresentar 9,02% de fosfolipases e 1.27% de L-amino ácido oxidases.

#### **1.4. L-aminoácido oxidases (LAAOs e SV-LAAOs)**

L-aminoácido oxidases (LAAOs, E.C.1.4.3.2) são flavoenzimas da classe das oxidoredutases que utilizam L-aminoácidos como substrato para o processo catalítico. As LAAOs realizam a deaminação oxidativa estereoespecífica desses substratos em  $\alpha$ -cetoácidos, com a liberação de amônia ( $\text{NH}_3$ ) e peróxido de hidrogênio  $\text{H}_2\text{O}_2$  (COSTA et al., 2018; TORRES et al., 2010).

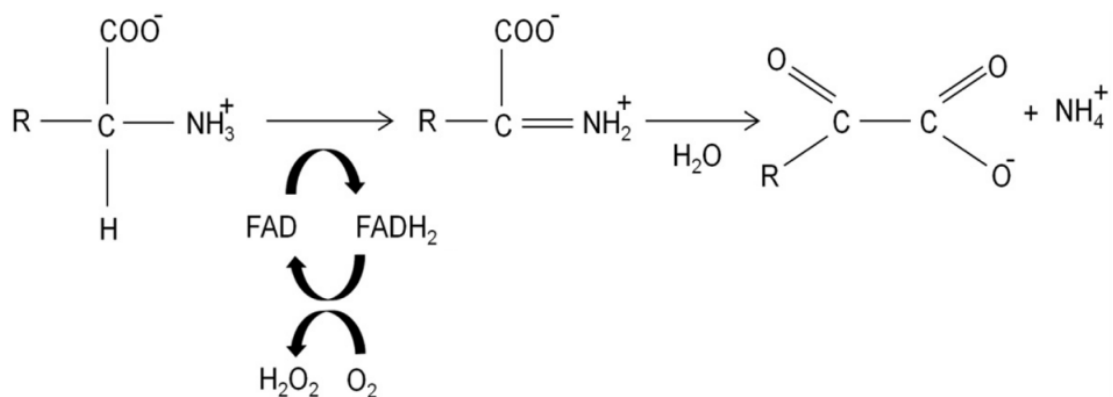
As LAAOs apresentam alta especificidade para aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos; enquanto que sua afinidade por aminoácidos polares, básicos e carregados positivamente é menor, além de suas interações eletrostáticas com o sítio catalítico serem desfavoráveis (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019). Estudos demonstraram amplas variações de massa, estabilidade, especificidade de substrato, atividades biológicas e enzimáticas em LAAOs de diversas fontes (COSTA et al., 2018).

Majoritariamente, LAAOs apresentam uma estrutura dimérica, na qual cada subunidade possui um mononucleotídeo ou dinucleotídeo de flavina, FMN e FAD, respectivamente, no sítio catalítico. Em LAAOs de peçonhas de serpentes (SV-LAAOs) a coenzima FAD é mais comumente encontrada geralmente ligada à enzima de forma não covalente, e esse sítio de ligação de FAD compartilha similaridades de sequência com outras LAAOs encontradas em diferentes tipos de organismos e animais (BORDON et al., 2015; COSTA et al., 2014). Ademais, flavinas são responsáveis pela coloração amarela característica de peçonhas com SV-LAAOs (GUO et al., 2012).

O ciclo catalítico das LAAOs começa com a redução do FAD em  $\text{FADH}_2$  e a formação concomitante de um intermediário iminoácido, que em sequência, sofre uma hidrólise não enzimática, liberando o  $\alpha$ -cetoácido e a

NH<sub>3</sub>. Para restaurar a coenzima, e assim começar uma nova catálise, o oxigênio molecular promove a reoxidação do FADH<sub>2</sub> em FAD, liberando H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (**Figura 3**) (COSTA et al., 2014). Essa molécula de O<sub>2</sub> adentra a cavidade catalítica por meio de um canal cheio de água que se estende desde a superfície exterior da enzima (perto do local de ligação do substrato) até ao centro catalítico (MOUSTAFA et al., 2006).

Moustafa et al., propôs a existência de uma segunda região, outro canal, direcionando a liberação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> do local catalítico. Uma rota em comum é inicialmente compartilhada por O<sub>2</sub> e H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, até uma bifurcação em forma de Y, que origina duas rotas de passagem, sendo uma para entrada de oxigênio e a outra para a liberação de peróxido de hidrogênio. Resíduos hidrofóbicos revestem predominantemente o canal de liberação do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> apresentando uma estrutura semelhante à presente na enzima catalase. Este canal independente é conhecido por se projetar para o exterior da enzima, se localizando perto da cadeia lateral de glicano que ancora a enzima à superfície da célula. A presença dessa característica estrutural proporciona um direcionamento do subproduto formado para a superfície celular, podendo esclarecer a diferença dos efeitos citotóxicos do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno e do H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> gerado por LAAOs (TAN et al., ).



**Figura 3. Mecanismo do ciclo catalítico de L-aminoácido oxidases.** (Adaptado de COSTA et al., 2014).

Estudos demonstraram que a atividade catalítica das LAAOs segue a cinética de Michaelis-Menten, onde cada enzima pode variar os valores de

$K_m$  e  $K_{cat}$  de acordo com o ambiente celular, concentração de substrato e características químicas da reação. Ademais, ainda conseguem catalisar reações em uma ampla faixa de pH, onde cada enzima possui um valor ótimo, e temperatura variando de 0 a 50°C; contudo, diferenças no pH, além de processos de congelamento e liofilização, podem ocasionar diminuição na atividade enzimática e/ou desnaturação proteica (IZIDORO et al., 2014).

As inativações decorrentes desses fatores (pH, temperatura e liofilização) envolvem modificações na interação enzima-substrato, assim como alterações na afinidade do FAD por elétrons, enquanto que o processo de congelamento causa perturbações nas interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre as diferentes subunidades da enzima (IZIDORO et al., 2014).

A atividade das LAAOs também pode ser inibida por diversos compostos como EDTA, PMSF, glutationa e 1, 10-fenantrolina, porque na presença desses inibidores enzimáticos a coenzima FAD é reduzida, causando a inativação da enzima (JIN, 2007). Fatores como alguns íons metálicos, solventes e cofatores apresentaram diferentes efeitos, podendo reduzir a estabilidade das LAAOs (BORDON et al., 2015; TORRES et al., 2010).

As LAAOs encontradas em peçonhas de serpentes, denominadas SV-LAAOs (Snake Venom L-Amino Acid Oxidases), também apresentam estrutura dimérica – sendo classificadas como homodímeros – que podem apresentar variações em suas massas moleculares de 120 até 150 kDa. Geralmente, são enzimas termolábeis que devem ser armazenadas na temperatura de 4°C em tampões com pH neutro; todavia, há relatos na literatura de SV-LAAOs mais estáveis à variações térmicas, de pH e período de armazenamento (COSTA et al., 2014, 2018).

Os monômeros presentes nessas enzimas são organizados tridimensionalmente em dois domínios: o domínio de ligação do substrato e o domínio de ligação do FAD, onde este último estabiliza a coenzima por meio de interações não covalentes (PAWELEK et al., 2000a). Georgieva et al., (2011) demonstrou que íons metálicos também ajudam na estabilização da estrutura quaternária da SV-LAAO isolada de *Vipera ammodytes*

*ammodytes*. A SV-LAAO CR-LAAO é uma enzima dimérica glicosilada, e um estudo sobre sua estrutura utilizando o aminoácido L-fenilalanina revelou um sítio ativo dinâmico, onde a cavidade catalítica sofre alterações conformacionais em resposta ao estado redox do FAD que está associado à enzima (MOUSTAFA et al., 2006).

Ainda não é bem elucidado o papel das SV-LAAOs na toxicidade e sinergia nos quadros de envenenamentos, contudo, pesquisas apontam que essa classe de enzimas pode contribuir para hemólise, miotoxicidade, edema e distúrbios do sistema hemostático (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019; IZIDORO et al., 2014). Entretanto informações da literatura demonstram que os efeitos locais e sistêmicos observados pelas SV-LAAOs podem estar, na maioria das vezes, relacionados ao H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> formado pela catálise enzimática; porque na presença da enzima catalase (capaz de degradar H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) a atividade das LAAOs é inibida (IZIDORO et al., 2014; TORRES et al., 2010).

SV-LAAOs de serpentes são encontradas em quantidades variadas nas diferentes espécies (RODRIGUES et al., 2009), oscilando entre 0,15 e 25%, e embora não seja uma das classes de toxinas mais abundantes e exploradas, é prevalente em muitas peçonhas (COSTAL-OLIVEIRA et al., 2019; FOX, 2013) e apresentam grande potencial biotecnológico. Por esse motivo, peçonhas de serpentes botrópicas têm sido purificadas para estudos microbicidas, antiparasitários e em células tumorais (COSTA et al., 2018).

### **1.5. Características gerais dos parasitos do gênero *Leishmania* e ciclo biológico**

O gênero *Leishmania* integra o reino protista, sub-reino Protozoa, ordem Kinetoplastida, a família Trypanosomatidae, e engloba organismos unicelulares digenéticos, que podem ser encontrados nas formas promastigota e amastigota (BAÑULS; HIDE; PRUGNOLLE, 2007; LAINSON, 2010). Insetos flebotomíneos (subfamília Phlebotominae) fêmeas, quando infectadas, fazem a transferência dos parasitos



*Leishmanias* para novos hospedeiros vertebrados, e aqueles que apresentam o desenvolvimento de doenças decorrente dessas infecções parasitárias, podem desenvolver casos de leishmanioses. Além do próprio meio de transmissão, ainda é possível encontrar reservatórios e outros vetores importantes para o ciclo biológico do gênero (WHO, 2019).

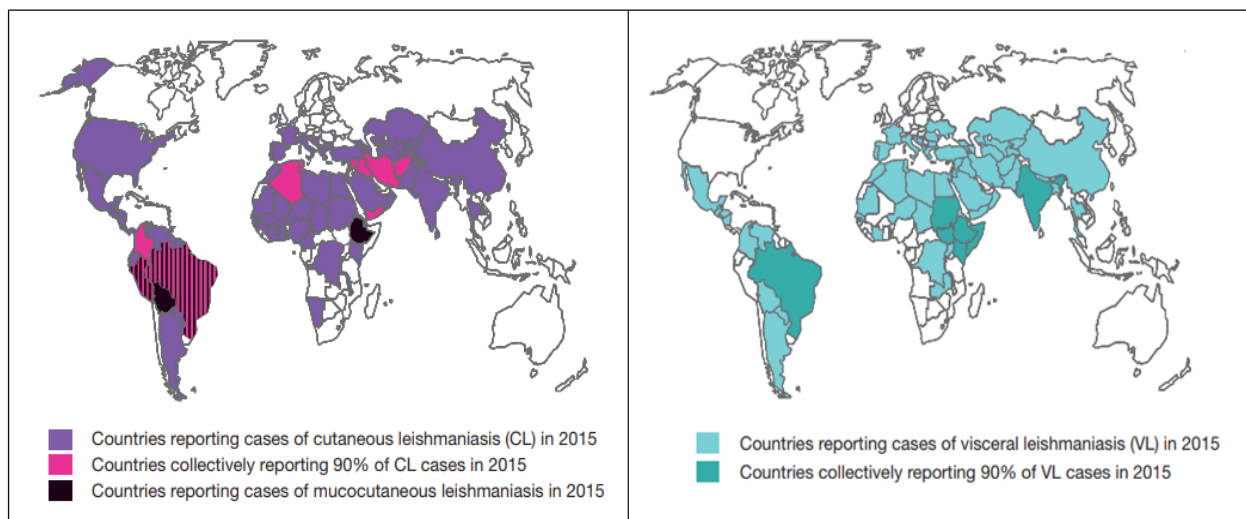
Leishmanioses são doenças negligenciadas, sendo endêmicas em 98 países e territórios diretamente ligados com altas taxas de pobreza e pouco saneamento básico. Fatores sociais, ambientais e climatológicos também são capazes de influenciar a epidemiologia das doenças, que podem ser classificadas em tegumentar e visceral (WHO, 2019).

Na leishmaniose tegumentar, os efeitos clínicos observados variam de acordo com as espécies de parasitas, podendo apresentar manifestações cutâneas com lesões ulcerosas (únicas ou múltiplas) na pele; mucosas quando afetam regiões oral e nasofaríngeas; ou cutâneo-difusa com lesões nodulares não-ulceradas (PORTELLA, 2018). Em geral, essa forma da doença não leva ao óbito, contudo ocasiona lesões desfigurantes e deformantes que apresentam impactos psicológicos e econômicos.

A leishmaniose visceral pode afetar o baço, fígado, medula óssea e linfonodos, produzindo febre e anemia. Geralmente é fatal se não for tratada e, em geral, apresenta manifestações clínicas como febre, emagrecimento, hepatomegalia e esplenomegalia. Representa maior gravidade por ser crônica e potencialmente fatal quando não tratada de forma correta (GONTIJO; MELO, 2004; PORTELLA, 2018).

A Organização Mundial de Saúde estima que ocorram cerca de 1.3 milhões de casos anualmente, incluindo a leishmaniose tegumentar e a visceral (**Figura 4**); além de estimar que mais de 300 milhões de pessoas estão com risco de transmissão, principalmente em países dos continentes africano, asiático e americano (sul da América do norte, América central e do sul). Em 2017, 94% de doenças notificadas ocorreram somente em 7 países, sendo eles Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão do Sul e Sudão. Apesar da grande incidência, a taxa de mortalidade só é alta quando não tratadas, pois a chance de sobrevivência é maior que 90% (WHO, 2019).

A infecção por *Leishmania* está completamente relacionada com o ciclo de vida heteroxênico desses parasitos (**Figura 5**), os quais necessitam de dois hospedeiros, sendo um vertebrado (mamíferos, marsupiais e roedores) onde são encontradas formas amastigotas não flageladas e intracelulares; e outro, o vetor de transmissão com formas promastigotas flageladas altamente móveis e infectivas (KIMA, 2007; SCHLEIN, 1993; SUNTER; GULL, 2017). Portanto, os parasitos de *Leishmania* possuem uma variedade de morfologias e tipos celulares, para se adaptarem tanto em relação ao hospedeiro vertebrado quanto ao vetor (SUNTER; GULL, 2017).



**Figura 4. Epidemiologia mundial de leishmanioses tegumentar e visceral** (Adaptado de WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2015).

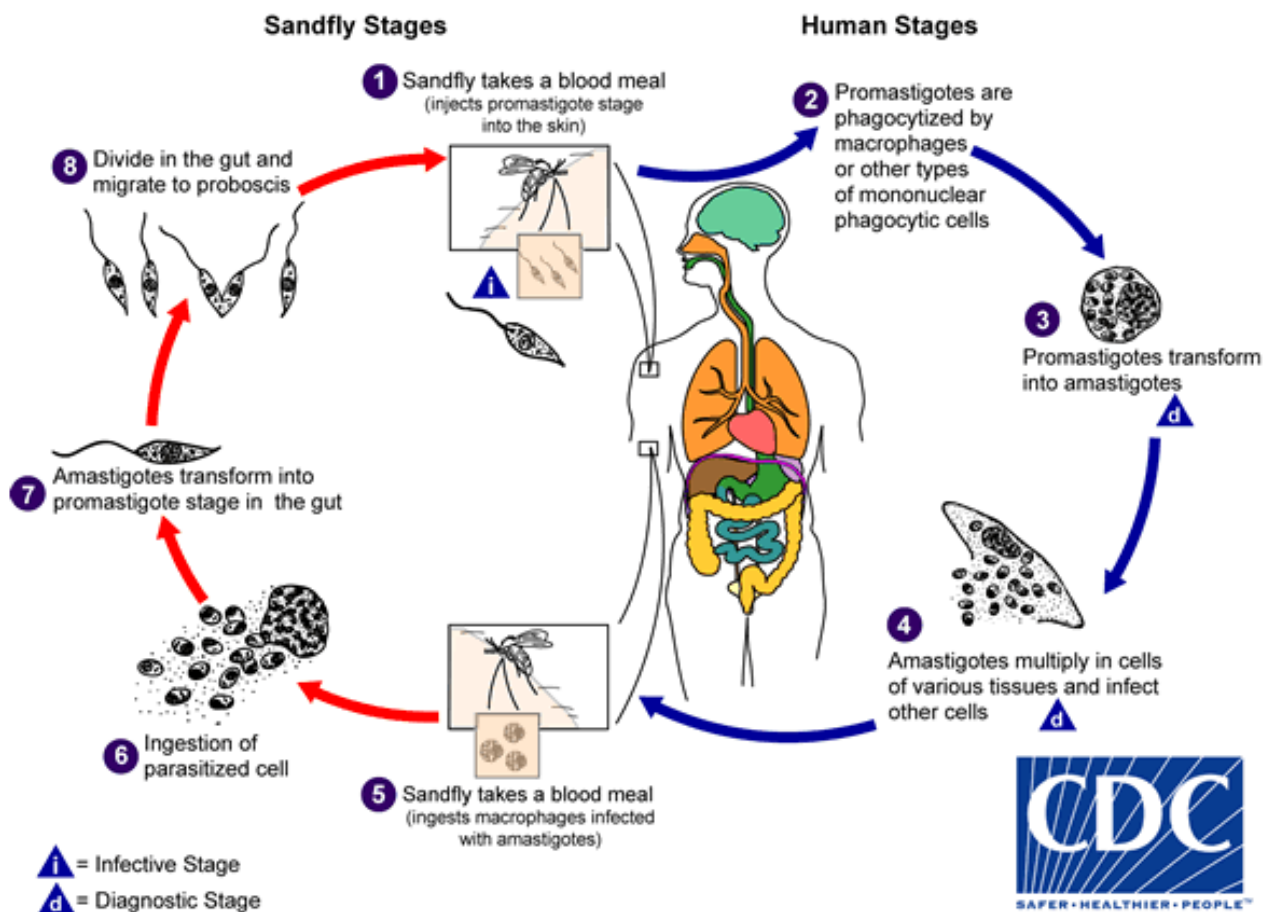
As formas amastigota do parasito possuem morfologia oval, esférica ou fusiforme com flagelo intracelular na região anterior, um núcleo grande e arredondado que ocupa um terço do corpo do parasito e diâmetro entre 1,5-3,0 x 3,0-6,5  $\mu\text{m}$ . As formas promastigota são encontradas livres no trato digestivo do vetor com morfologia alongada e presença de um flagelo livre e longo na região anterior, um núcleo oval ou arredondado no meio ou ligeiramente na porção anterior do corpo do parasito e diâmetro variando

entre 10,0-40,0 x 1,5-3,0  $\mu\text{m}$ , no qual o flagelo possui medidas iguais ou maiores que o corpo (NEVES, 2005).

Apesar da morfologia dos parasitos ser dividida em formas amastigota e promastigota durante o ciclo biológico, existem variações de promastigota (definidas como diferentes tipos de células de desenvolvimento) dentro do vetor flebotomíneo. São encontradas quatro tipos principais, promastigota prócíclica com comprimento entre 6,5 e 11,5  $\mu\text{m}$  e flagelo menor que o corpo celular; promastigota nectomonada com corpo celular maior que 12  $\mu\text{m}$ ; promastigota leptomonada apresentando o comprimento entre 6,5 e 11,5  $\mu\text{m}$  e flagelo maior que o corpo celular; e promastigota metacíclica com comprimento inferior a 8 x 1  $\mu\text{m}$  de largura e flagelo maior que o corpo celular (SUNTER; GULL, 2017).

Sabe-se que estes quatro tipos celulares de formas promastigota representam uma sequência de desenvolvimento dentro do vetor, na qual o promastigota prócíclico altamente replicativo e pouco infectivo (presente no sangue que o flebotomíneo obtém através do repasto sanguíneo), se diferencia em nectomonada. Quando a matriz peritrófica se rompe formas promastigota, direcionadas para o intestino médio torácico, transformam-se em leptomonadas e posteriormente em formas promastigota metacíclicas, imensamente infectivas mas pouco replicativas (SUNTER; GULL, 2017).

O ciclo biológico começa com a transferência de formas promastigota metacíclicas, durante o repasto sanguíneo da fêmea do flebotomíneo para o hospedeiro. Parasitos são rapidamente fagocitados por células fagocíticas mononucleares, principalmente macrófagos, onde os parasitos diferenciam-se em amastigotas – com alta taxa de divisão binária – e infectam mais células do sistema fagocitário mononuclear. Uma vez que o hospedeiro vertebrado possui formas amastigota livres e intracelulares, durante um novo repasto sanguíneo, os flebotomíneos ingerem junto com o sangue, a forma amastigota, a qual irá se diferenciar novamente em promastigota no inseto (**Figura 5**). Portanto, se o vetor já estiver previamente contaminado antes de fazer o repasto do hospedeiro infectado, é capaz de possuir ambas as formas (promastigota e amastigota) em seu organismo (GONTIJO, 2003; NIEVES; PIMENTA, 2000; PREVENTION, 2019).



**Figura 5. Ciclo de vida e infecção de parasitas do gênero *Leishmania*.** Formas promastigota presentes na fêmea flebotomíneo (1) são fagocitados por células fagocíticas mononucleares (2), onde se diferenciam em amastigotas (3) que se multiplicam e infectam outras células sistema mononuclear fagocitário (4). Flebotomíneos são infectados durante o repasto sanguíneo com formas amastigotas (5), que são liberadas dentro do inseto (6). Amastigotas transformam-se em promastigotas metacíclicas no intestino (7) e migram para o probóscide do flebotomíneo (8) (CDC, 2019).

No gênero *Leishmania* encontram-se dois subgêneros, *Leishmania* e *Viannia*, que se diferem baseados no local de desenvolvimento dos parasitos dentro do inseto vetor; logo, espécies do subgênero *Leishmania* se desenvolvem no intestino médio do flebotomíneo, enquanto que espécies do subgênero *Viannia* se diferenciam no intestino grosso do inseto vetor. Englobam cerca de 30 espécies conhecidas e, no Brasil, as

espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* estão entre os parasitas causadores de leishmaniose tegumentar, sendo a segunda espécie, causadora da forma mais grave (mucocutânea) da doença (NOGUEIRA; SOTTO; CUCÉ, 2008; PORTELLA, 2018; SILVEIRA; LAINSON; CORBETT, 2004).

Ao longo do tempo, é possível encontrar na literatura diversos estudos biológicos com SV-LAAOs de autores como Tempone et al., (2001); Izidoro et al., (2006); Toyama et al., (2006); Ciscotto et al., (2009); Rodrigues et al., (2009); Torres et al., (2010); Naumann et al., (2011); Paiva et al., (2011); Bregge-Silva et al., (2012); Costa et al., (2015) e Carone et al., (2017) que reportam atividade antiparasitária dessas enzimas, em várias espécies de *Leishmanias*, nas quais, os efeitos citotóxicos são geralmente atribuídos ao peróxido de hidrogênio.

Portanto, para este trabalho, a hipótese de que a citotoxicidade das LAAOs poderia ser decorrente também de outros fatores além da formação do subproduto  $H_2O_2$ , conduziu análises relacionadas à estudos estruturais, atividades enzimáticas específicas de LAAOs e atividades biológicas em parasitos do gênero *Leishmania*, com duas L-aminoácido oxidases isoladas de peçonhas botrópicas.

## **2. OBJETIVO**

### **2.1. Objetivo geral**

O objetivo do presente trabalho foi realizar um estudo comparativo do efeito antiparasitário de duas L-aminoácido oxidases (BjussuLAAO-II e BmooLAAO) isoladas das peçonhas das serpentes *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni*, sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### **2.2. Objetivos específicos**

- Isolamento das SV-LAAOs de *B. jararacussu* (BjussuLAAO-II) e *B. moojeni* (BmooLAAO) por diferentes etapas cromatográficas;

- Determinação da atividade específica de LAAO de BjussuLAAO-II e BmooLAAO utilizando o aminoácido L-leucina e o meio de cultura LIT completo como substrato;
- Análise do sequenciamento das enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO;
- Realização de análises *in silico* comparativa das SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO;
- Avaliação do efeito citotóxico de BjussuLAAO-II e BmooLAAO sobre as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis* pelo método de MTT;
- Avaliação da interferência das enzimas na proliferação de parasitos;
- Avaliação dos efeitos das SV-LAAOs no potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dos parasitos;
- Quantificação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular com a sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA pelas espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.

### 3. MATERIAL E MÉTODOS

#### 3.1. Purificação das LAAOs botrópicas BjussuLAAO-II e BmooLAAO

A purificação das SV-LAAOs foi feita conforme descrição de Carone et al (2017), que já tinha isolado a BjussuLAAO-II, em parceria com a Prof<sup>a</sup>. Dra. Suely Vilela e com o Laboratório de Toxinas Animais do Departamento de Análises Clínicas, Toxicológicas e Bromatológicas, da Faculdade de Ciências Farmacêuticas de Ribeirão Preto - SP. As peçonhas de *B. jararacussu* e *B. moojeni* foram doadas pelo Centro de Estudos de Venenos e Animais Venenosos (CEVAP) da UNESP (Botucatu, SP, Brasil) e armazenados a -20 °C.

As metodologias de purificação foram iguais para as duas SV-LAAOs. Inicialmente 150 mg de peçonha bruta cristalizada de *B. jararacussu* ou *B. moojeni* foi fracionada por cromatografia de exclusão molecular em coluna Sephacryl S-100 (62 x 1,7 cm; Amersham, GE

Healthcare Life Science, Pittsburgh, PA, EUA) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 8.0 contendo NaCl 150 mM. A eluição foi realizada utilizando o mesmo tampão a um fluxo de 12 mL/h, seguida da leitura de absorbância a 280 nm. As frações recolhidas (1 mL) foram reunidas de acordo com o perfil cromatográfico e analisadas quanto à atividade de LAAO. A fração ativa foi concentrada e dessalinizada em filtros Amicon Ultra (membrana YM 30.000) para trocar o tampão inicial pelo tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.4 contendo NaCl 4 M. A fração que apresentou atividade de LAAO eluída da gel filtração (30 mg), foi aplicada em coluna Phenyl-Sepharose 6 FastFlow (25 x 1,5 cm; Amersham), operada por um sistema FPLC (GE AKTA FPLC™), previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 10 mM pH 7.6 contendo NaCl 4 M. Um gradiente linear reverso de NaCl (4-0 M) em água deionizada foi aplicado, e frações de 3 mL foram recolhidas à um fluxo de 72 mL/h, a 25°C. A fração com atividade de LAAO foi novamente concentrada por ultrafiltração em membrana YM 30.000, lavada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.4 com NaCl 0,5 M e armazenada a 4°C. Novamente a fração que apresentou atividade de LAAO foi utilizada, e o eluído da coluna de interação hidrofóbica (1,3 mg) foi aplicado em coluna de afinidade Benzamidina Sepharose 4 FastFlow (7,5 x 1,0 cm; Amersham) previamente equilibrada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.4 contendo NaCl 0,5 M. Foi realizada uma eluição sequencial com Tris-HCl 20 mM + NaCl 0,5 M pH 7.4; Tris-HCl 20 mM + NaCl 1 M pH 7.4; e tampão glicina-HCl 50 mM pH 3.0, em um fluxo de 36 mL/h, à temperatura ambiente, seguido da leitura de absorbância a 280 nm. As frações eluídas com tampão glicina foram neutralizadas com 0,5 mL de tampão Tris-HCl 1 M pH 9.0; e além disso, frações de 3 mL foram recolhidas e analisadas quanto à atividade de LAAO. A fração ativa foi concentrada por ultrafiltração (membrana YM 30.000), lavada com tampão Tris-HCl 20 mM pH 7.4 e armazenada a 4°C.

A pureza da fração ativa foi analisada por SDS-PAGE utilizando gel de poliacrilamida a 12% (m/v), de acordo com Laemmli (1970). O gel foi corado com azul de Coomassie G a 0,2% durante 30 minutos e descorado com ácido acético a 10% em solução de água / etanol 50:50 (v/v). Marcadores de massa molecular (Thermo Fischer Scientific, Waltham, MA,

EUA) também foram aplicados no gel como padrão:  $\beta$ -galactosidase (116 kDa), albumina de soro bovino (66,2 kDa), ovalbumina (45 kDa), lacto desidrogenase (35 kDa), rease Bsp981 (25 kDa),  $\beta$ -lactoglobulina (18,4 kDa) e lisozima (14,4 kDa).

### **3.2. Atividade específica de LAAO**

A atividade das SV-LAAOs foi determinada em um ensaio com peroxidase de rabanete, no qual o peróxido de hidrogênio ( $H_2O_2$ ) gerado pela LAAO, na presença de um aminoácido hidrofóbico como a L-leucina, é consumido pela peroxidase para oxidar a o-fenildianisidina (OPD), gerando um radical cátion que é monitorado a 490 nm em espectrofotômetro (MOUSTAFA et al., 2006).

A atividade de LAAO foi realizada utilizando o método descrito por Bordon et al., (2015) com algumas modificações. Em 0,5 mL da solução de ensaio (5 mL de L-Leucina (0,1% em Tris-HCl 0,1M, pH 7,2) ou 5 mL de meio LIT completo; 10  $\mu$ L de peróxido de rabanete (1 mg/mL); 50  $\mu$ L de uma solução de OPD (10 mg/mL em metanol)) foram incubadas diferentes concentrações das SV-LAAOs. A reação foi interrompida após 30 minutos com a adição de 0,5 mL de ácido cítrico 10% (m/v) sendo a absorbância determinada em 490 nm (BORDON et al., 2015). O teste de atividade específica foi realizado para monitorar as frações de todas as etapas cromatográficas e antes de todos os ensaios biológicos experimentais, de modo a verificar se a proteína estava realmente ativa.

Os valores de absorbância obtidos foram usados para calcular a atividade específica das LAAOs em U/mg/min, que corresponde a quantidade de  $H_2O_2$  ( $\mu$ mol) formada por minuto por miligrama de enzima. O  $H_2O_2$  formado foi quantificado a partir de uma curva padrão expressa em nmol/min, e os resultados foram expressos como porcentagens de atividade relativa.



### 3.3. Sequenciamento das LAAOs por espectrometria de massas

Os sequenciamentos de novo das enzimas BjussuLao-II e BmooLAAO, foi realizado em parceria com a Dra. Fernanda Gobbi Amorim do Laboratório de Fisiologia e Farmacologia Translacional da Universidade de Vila Velha (UVV - ES) e com o Laboratory of Mass Spectrometry da Universidade de Liège na Bélgica em colaboração com os professores Dr. Loic Quinton e Dr. Edwin De Pauw. Para tanto, 10 µg de cada toxina foi submetida a redução, alquilação e digestão enzimática. As toxinas foram reduzidas com 3,2 µL de ditioneitol 0.5 M (DTT) e 6 µL de NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> 0,05 M, durante 40 minutos a 56°C. As amostras foram então alquiladas com 6,4 µL de iodoacetamida 0.5 M (IAA) e incubadas a 37°C durante 30 minutos, no escuro. Em seguida foi realizada uma etapa adicional de redução com 3,6 µL de DTT 0,5 M. As toxinas foram digeridas com enzima tripsina porcina em duas etapas, sendo na primeira etapa na proporção de 1:50 de tripsina:proteína com incubação *overnight* a 37°C a 300 rpm e na segunda na proporção de 1:100 com incubação a 37°C a 300 rpm por 3h. Após a digestão, a reação foi interrompida por ácido fórmico a 1% (concentração final), submetida a dessalinização por colunas C18 ZipTip e eluída numa solução de acetonitrila/água/ácido fórmico (49.8/50/0.2 v/v).

O material digerido também foi analisado usando UPLC nanoACQUIDADE (Waters, UK) acoplada a um espectrômetro de massa Q-Exactive Hybrid Quadrupole-Orbitrap (ThermoScientific, EUA). O sistema cromatográfico é equipado com uma coluna capilar monolítica (PepSwift, 100 µm x 5 cm, ThermoScientific, EUA). A eluição dos peptídeos foi realizada com gradiente de 3-50% de solução B durante 80 minutos (A: água/ácido fórmico 0,1%; B: acetonitrila) com um fluxo de 0,7 mL/min e as aquisições foram realizadas no modo positivo. Os sequenciamentos de novo das toxinas foram realizados com o software PEAKS Studio X (ZHANG et al., 2012) com base na sequência da L-aminoacido oxidase de *Bothrops moojeni* (depósito NCBI ATU85535.1) identificada no transcriptoma realizado por Amorim et al. (2017). A carbamidometilação foi definida como modificação fixa e oxidação (M) como modificações variáveis. Foram definidos os erros para os fragmentos de massas de 15

ppm, ion pai de 0,2 Da, false discovery ratio (FDR) de 1%, e peptídeos únicos  $\geq 2$  foram usados para filtrar proteínas imprecisas para a pesquisa SPIDER.

### 3.4. Análises *in silico*

As análises de bioinformática foram feitas em parceria com o Dr. Ricardo Pereira Rodrigues do Programa de Pós-Graduação em Ciências Farmacêuticas da Universidade Federal do Espírito Santo. A busca por potenciais modelos para modelagem por homologia da sequência primária de *Bothrops moojeni* foi executada a partir do servidor SWISS-MODEL (SMTL, última atualização: 2019-05-15, última versão do PDB incluída: 2019-05-10) e para isso, foi selecionado como modelo, a estrutura da L-aminoácido oxidase de *Bothrops jararacussu* (ULLAH et al., 2012). A sequência alvo foi pesquisada com o servidor BLAST (CAMACHO et al., 2009) e 106 modelos foram encontrados. Os modelos foram criados com base no alinhamento do modelo de destino e aquelas coordenadas que são conservadas entre o *output* e o *input* são utilizadas no modelo gerado. Inserções e exclusões são remodeladas usando uma biblioteca de fragmentos, reconstruindo as cadeias laterais e a geometria do modelo resultante é regularizada usando um campo de força. A qualidade do modelo foi avaliada usando a função de escore QMEAN parametrizada para o servidor SWISS-MODEL (BENKERT; BIASINI; SCHWEDE, 2011). No caso da modelagem de loops com o PROMOD3 falhar, um modelo alternativo é construído com o PROMOD-II (GUEX; PEITSCH; SCHWEDE, 2009).

### 3.5. Cultivo dos parasitos

Parasitos na forma promastigota das espécies *L. (L.) amazonensis* (cepa IFLA/BR/67/PH8) e *L. (V.) brasiliensis* (cepa MHOM/BR/75/M2904) foram cultivados em meio LIT (Liver Infusion Tryptose), pH 7,4, suplementado com 10% (v/v) de SFB, 2% (v/v) glicose, 1% (v/v) de penicilina (10,000UI mL<sup>-1</sup>) e estreptomicina (10 mg mL<sup>-1</sup>) – meio LIT

completo – à  $23^{\circ}\text{C} \pm 0.5^{\circ}\text{C}$  na B.O.D. Os parasitos promastigota utilizados em todos os experimentos foram selecionados na fase estacionária de crescimento.

### **3.6. Ensaio de citotoxicidade**

A citotoxicidade dos tratamentos foi avaliada pelo ensaio colorimétrico com o reagente MTT, segundo Mosmann (1983) com algumas modificações. Promastigotas ( $5 \times 10^5$  parasitos por poço) de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, foram incubados com meio LIT completo (controle), na presença e ausência de catalase (150 U por poço), ou com diferentes concentrações das LAAOs botrópicas a partir de uma diluição dupla seriada, começando com  $12,5 \mu\text{g/mL}$ , em placa de 96 poços por 24h à  $23^{\circ}\text{C} \pm 0,5^{\circ}\text{C}$  na B.O.D. Passado o tempo dos tratamentos, foram adicionados  $20 \mu\text{L}$  do reagente MTT em cada poço, e as placas – tanto com macrófagos quanto com parasitos – foram colocadas na incubadora de  $\text{CO}_2$ , durante 3h. Os cristais de formazan oriundos da metabolização do MTT, foram solubilizados em SDS 10% (v/v - diluído em PBS 1x com HCl 0,01 M) *overnight* na incubadora. A densidade óptica foi determinada a 570 nm em leitor de placas (TitertekMultiskan Plus, FlowLaboratories, Mc Lean, USA) e os resultados foram demonstrados em porcentagens de viabilidade, para macrófagos e tratamento com catalase; e, citotoxicidade para parasitos. Foram realizados três experimentos independentes em triplicata.

### **3.7. Ensaio antiproliferativo**

A fim de avaliar os efeitos das LAAOs na proliferação dos parasitos, formas promastigota das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* ( $5 \times 10^6$  parasitos por mL) foram cultivadas com meio LIT completo (controle) ou com diferentes concentrações das L-aminoácido oxidases. Em ambas as espécies foram utilizadas duas concentrações de cada enzima, que apresentavam aproximadamente 80 e 50% de citotoxicidade. Para a espécie *L. (L.) amazonensis*, foi utilizado  $1,563$  e  $0,195 \mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II; e,  $6,25$  e  $1,563 \mu\text{g/mL}$  de BmoLAAO; enquanto que para *L.*

(*V.*) *braziliensis* utilizou-se 1,563 e 0,391 µg/mL de BjussuLAAO-II; e, 6,25 e 1,563 µg/mL de BmooLAAO. Formas promastigota foram incubadas com as enzimas de interesse por 24h à 23°C ± 0.5°C na B.O.D, e alíquotas foram retiradas nos tempos de 0, 6, 12 e 24h. Após fixação com paraformaldeído 1% em tampão cacodilato, cada alíquota foi posteriormente diluída 100x em azul de tripan 0,04% para contagem dos parasitos em câmara de Neubauer. Este experimento foi realizado em triplicata por três vezes independentes.

### **3.8. Avaliação da alteração do potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) nos parasitos do gênero *Leishmania***

Mitocôndrias viáveis permitem a entrada e o acúmulo do corante fluorescente Rh 123 (rodamina 123) no espaço intracelular da organela, logo, uma alteração na fluorescência do corante permite observar se o tratamento de interesse é capaz de alterar o potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dos parasitos. Formas promastigota ( $5 \times 10^6$  parasitos por mL) das duas espécies foram cultivadas com meio LIT completo (controle) ou com diferentes concentrações das LAAOs, em placa de 24 poços à 23°C ± 0.5°C na B.O.D. Para espécie *L. (L.) amazonensis*, foi utilizado 0,195 µg/mL de BjussuLAAO-II e 1,563 µg/mL de BmooLAAO; enquanto que para *L. (V.) braziliensis* utilizou-se 0,391 µg/mL de BjussuLAAO-II; e, 1,563 e 0,781 µg/mL de BmooLAAO. Após 24h, os parasitos foram lavados em PBS e incubados com Rh 123 (15 µg/mL) por 15 minutos a 25°C com proteção contra luz. Posteriormente, os parasitos foram lavados novamente com PBS, fixados com 1% de paraformaldeído em tampão cacodilato por 10 minutos, lavados e armazenados em tampão PBS. A análise da população celular foi feita no citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences), e no mínimo, 10.000 eventos foram contabilizados na região previamente estabelecida como correspondente aos parasitos. O software FLOWJo foi utilizado para realização da estratégia de *gating* e análise da intensidade de fluorescência, e os gráficos foram montados no GraphPrism Software versão 8.1.2, utilizando as medianas da fluorescência. Este experimento foi realizado em triplicata por três vezes independentes.

### 3.9. Determinação da geração de espécies reativas de oxigênio (EROs) em parasitos do gênero *Leishmania*

Com o objetivo de verificar a produção de espécies reativas de oxigênio (ROS – reactive oxygen species) intracelular, formas promastigota ( $5 \times 10^6$  parasitos por mL) das duas espécies foram cultivadas com meio LIT completo (controle) ou com diferentes concentrações das LAAOs, em placa de 24 poços à  $23^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$  na B.O.D. Para espécie *L. (L.) amazonensis*, foi utilizado 0,195  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II e 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmoLAAO; enquanto que para *L. (V.) braziliensis* utilizou-se 0,391  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II e 1,563 de BmooLAAO. Após 6h de tratamento, os parasitos foram centrifugados a 2.000 rpm por 7 minutos e lavados com PBS. Em seguida, foram incubados com 20  $\mu\text{M}$  da sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA (5-(e 6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester - Sigma) e 10  $\mu\text{g/mL}$  de PI por 1h protegido da luz na B.O.D. Controles positivos para PI e ROS foram feitos incubando previamente os parasitos com 4% (v/v) de formol (30 minutos), e com 20  $\mu\text{M}$  de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Sigma - 20 minutos), respectivamente; e, posteriormente lavando com PBS e incubando com 10  $\mu\text{g/mL}$  de PI e 20  $\mu\text{M}$  da sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA por 1h. Para este teste, pelo menos 15.000 eventos foram obtidos em cada grupo (controle, tratados e controles positivos para PI e ROS) no citômetro de fluxo (FACSCantoll, BD Biosciences), e o software FLOWJo foi utilizado para realização da estratégia de *gating* e análise da intensidade de fluorescência, e os gráficos foram montados no GraphPrism Software versão 8.1.2, utilizando as medianas da fluorescência. Ademais, o resultado também foi apresentado em gráfico de quadrantes obtido pela análise do citômetro. Este experimento foi realizado em triplicata por três vezes independentes.

### 3.10. Análises estatísticas

Os dados obtidos foram inicialmente verificados pelo teste de normalidade na distribuição Gaussiana e os resultados foram expressos como média  $\pm$  desvio padrão. A análise estatística foi realizada pelos níveis de significância do teste t considerados dentro do intervalo de confiança  $0.1 < p < 0,05$  e as diferenças significantes foram determinadas por ANOVA e teste de comparações múltiplas de Tukey (GraphPad Prism Software version 8.1.2). As medidas foram consideradas como:  $p < 0,1$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*).

## 4. RESULTADOS

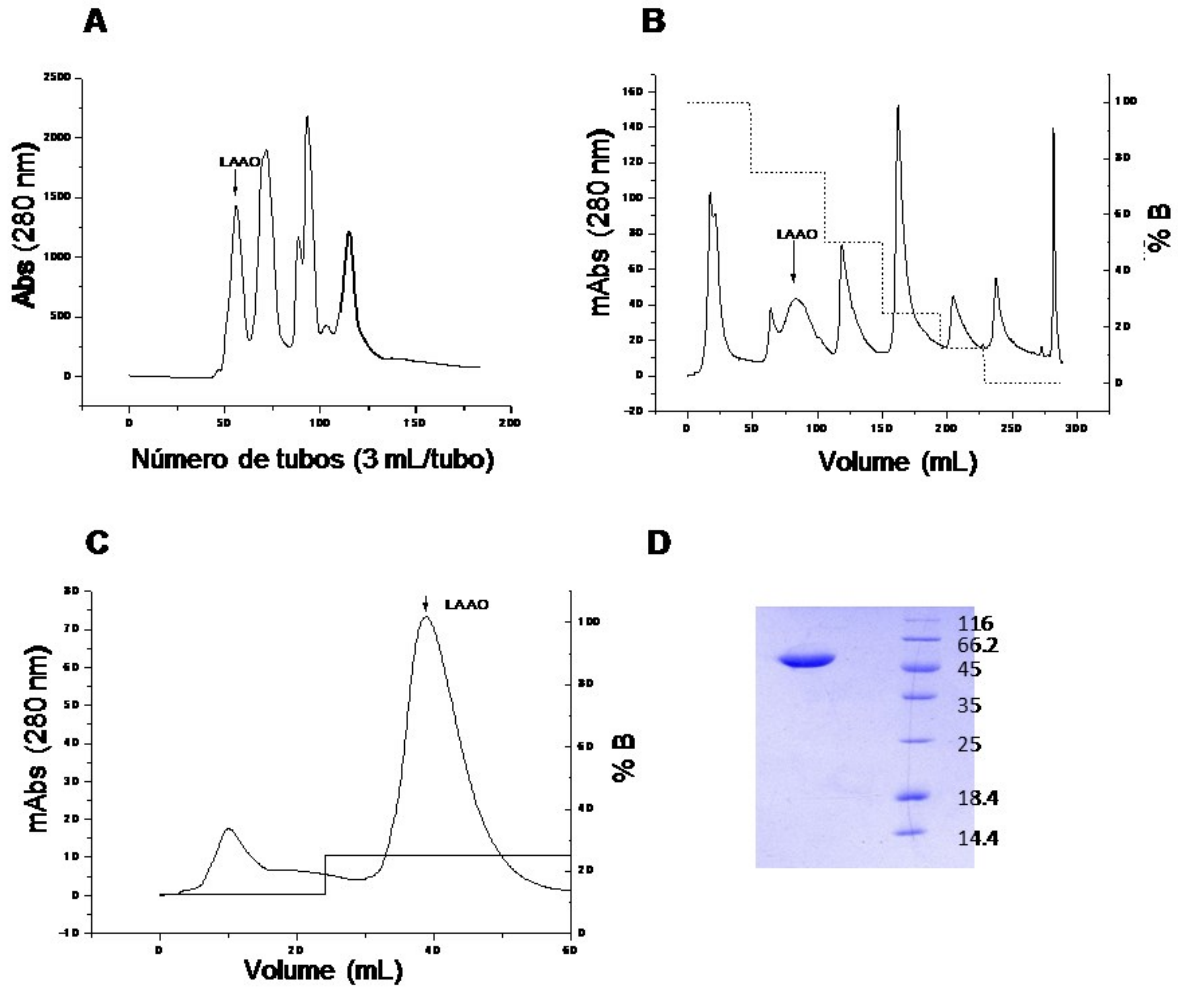
### 4.1. Purificação das SV-LAOs botrópicas e atividade específica de LAO para cada enzima

As LAOs botrópicas BjussuLAO-II e BmooLAO foram purificadas com sucesso, seguindo a metodologia descrita por Carone et al. (2017) para as duas enzimas, utilizando 3 passos cromatográficos.

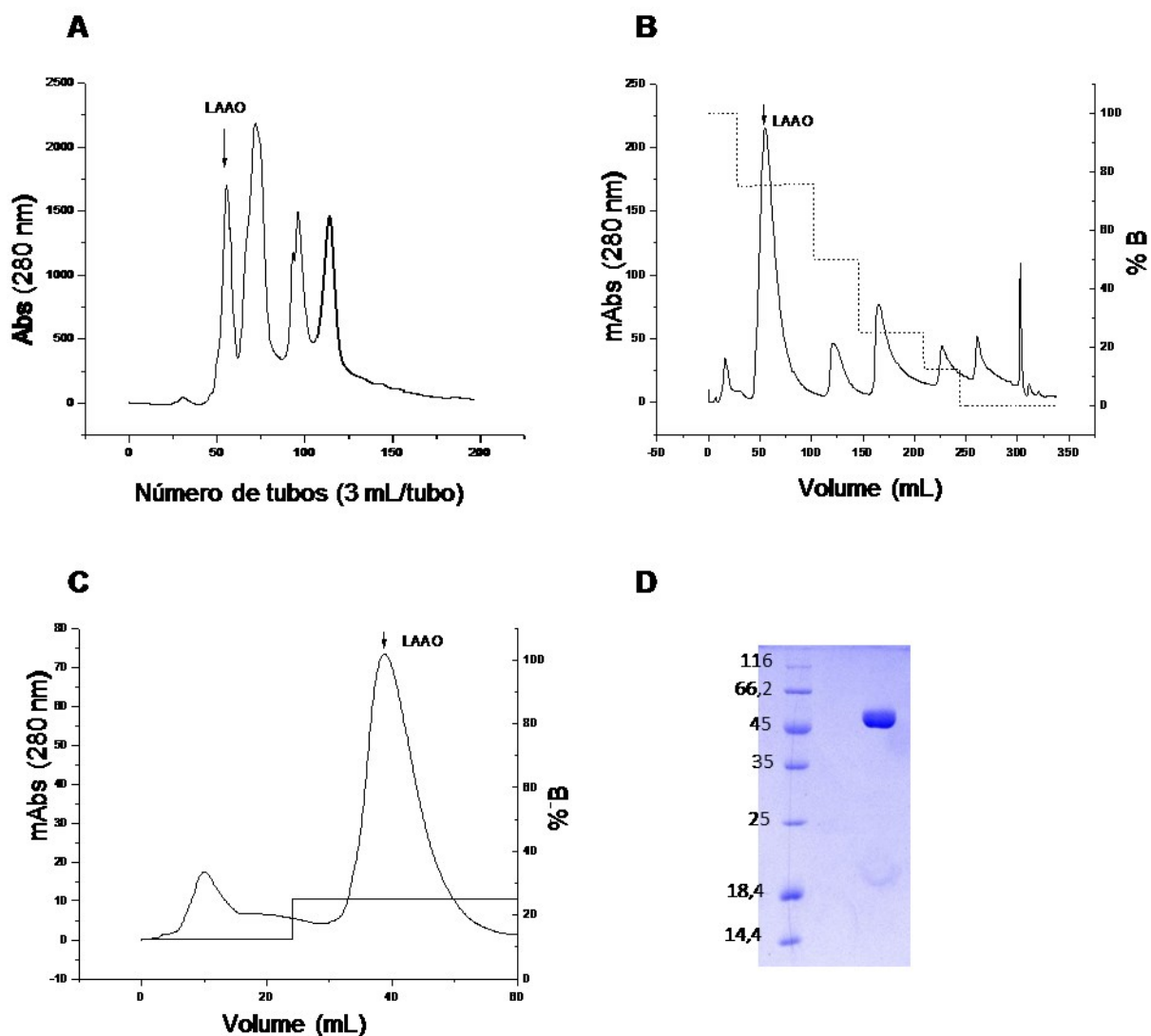
Primeiramente, foi feita uma exclusão molecular em Sephacryl-S100 obtendo 4 picos (**Figuras 6A e 7A**). As frações que apresentaram maior atividade específica de LAO (picos 1 para as duas LAOs botrópicas), foram submetidas à uma interação hidrofóbica em Phenyl-Sepharose originando um perfil cromatográfico de 8 picos para BjussuLAO-II e 7 picos para BmooLAO (**Figuras 6B e 7B**). Novamente, foram selecionadas as frações com maior atividade específica de LAO, e em seguida, os picos 3 e 2 para BjussuLAO-II e BmooLAO, respectivamente, (**Figuras 6B e 7B**) foram subfracionados por afinidade em coluna Benzamidina Sepharose, obtendo 2 picos em cada purificação de LAO (**Figuras 6C e 7C**).

As duas LAOs botrópicas, BjussuLAO-II e BmooLAO apresentaram massas moleculares de 60 kDa (Carone et al., 2017) e próximo de 45 kDa, respectivamente, (**Figuras 6D e 7D**); e ainda, alta atividade específica após o último passo cromatográfico de 3481,17

U/mg/min para BjussuLAAO-II e 4924,77 U/mg/min para BmooLAAO (Figura 8).

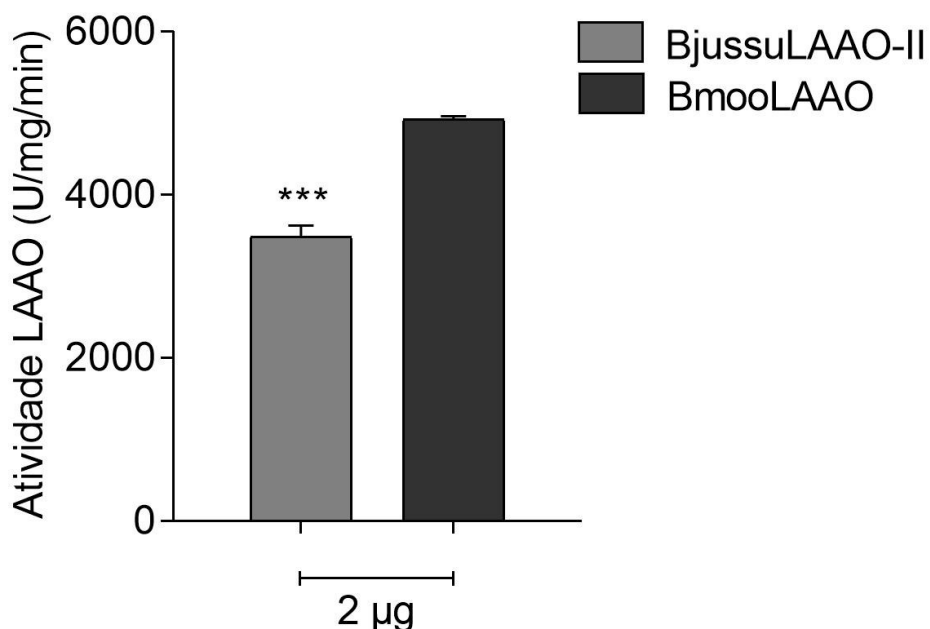


**Figura 6. Processo de purificação da enzima BjussuLAAO-II.** Um total de 125 mg de peçonha bruta de *Bothrops jararacussu* foi utilizado inicialmente. **A:** Perfil cromatográfico da exclusão molecular Sephacryl S-100. **B:** Perfil cromatográfico da coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose 6 FastFlow. **C:** Perfil cromatográfico da purificação por afinidade em Benzamidina-Sepharose 4 FastFlow. **D:** Gel de eletroforese após passos de purificação mostrando a BjussuLAAO-II purificada.



**Figura 7. Processo de purificação da enzima BmooLAAO.** Um total de 125 mg de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foi utilizado inicialmente **A:** Perfil cromatográfico da exclusão molecular Sephacryl S-100. **B:** Perfil cromatográfico da coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose 6 FastFlow. **C:** Perfil cromatográfico da purificação por afinidade em Benzamidina-Sepharose 4 FastFlow. **D:** Gel de eletroforese após passos de purificação mostrando a BmooLAAO purificada.





**Figura 8. Atividade específica de LAAO das enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO purificadas.** Foram incubados 2 µg de cada enzima com o aminoácido L-leucina durante 30 minutos, e após a paragem da reação a absorbância de cada amostra foi lida em espectrofotômetro à 490 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,001$  (\*\*\*)).

#### 4.2. Sequenciamento das LAAOs por espectrometria de massas

Os sequenciamentos realizados permitiram a obtenção de grande parte das sequências das duas LAAOs botrópicas (**Figura 9**). Pelo ClustalOmega (<https://www.ebi.ac.uk/Tools/msa/clustalo/>) foi possível observar que ambas enzimas, BjussuLAAO-II e BmooLAAO, apresentaram alta identidade, de 96.2% e 93.4% respectivamente, com a sequência modelo ATU85535.1 –LAAO da peçonha de *B. moojeni* obtida do estudo transcriptômico por Amorim et al., (2017) - (**Figura 10**), além de 91.59% de identidade entre si. O alinhamento entre BmooLAAO (presente trabalho) e BmooLAAO-I (GI: 82127389), uma L-aminoácido oxidase descrita por Stábéli et al., (2007), exibiu uma identidade de 91.96%, confirmando uma possível purificação de uma isoforma presente na peçonha de *B. moojeni*.

> BjussuLao-II

```
MNVFFTF SLLFLAALGSRADDRWPLEECFRRTDYEEFLEIAKNGLSTTSNPKRVMVGAGMSG  
RAAYRLANAGHQVTVLEASER*****YTYREEKEGWYANLGPMRLPEKHRIVREYIRKFDLQ  
LNEFSQENENAWYFIK***RVGEVNKDPGVLDPVKPSEVGRRAGQHYEESLQKAVEELRRTNCSY  
MLNKYDTYSTKEYLLK*****SFIESLKHDDIFAYEKRFDEIVGMDKMPTSMYQ  
AIQEKRHLNARVIKQQDVKEVTVTYQNSAKETLSVTADYVIVCTTSR***RIKFEPPLPPKAHAL  
RSVHYRSGTKIFLTCTKFWEDDGIHGKSTTDLPSRFIYPNHNFPNGVVIAY*****  
DCGDIVNDLSLHQLPKEEIQAFCRPSMIQRWSLDKYAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPVDRIY  
FAGEYTAQAHGWDSTIK*****
```

> BmooLao

```
MNVFFTF SLLFLAALGSRADDRNPLEECYRRANYEEFSETAKNGLSTTSNPKRVMVGAGMSG  
LSAARRLANQGHQVTVLEASERAGGRVKTYRNEKQGWYANHGPMRPPRHRIVREYIRKFDL  
HLNEFSQENENAWYFIKNIRKRVGEVNKDPGVLQYPVKPSEEGKSAGELYEESLQKAVEELRR  
TNCSYMLNKYDTYSTKEYLLKRGNLSPGAVDMIG****DSGYVVSFIESLKHDDIFAYEKRFDEIV  
GGMDKLPTSMYQAIQEKVHLNAR***IQQDVKEVTVTYQTSEKETLSATADYVIVCTTSRAARRIK  
FEPPLPEKEHALRSVHYRSGTKIFLTCTEDFWEDDGIHRGKSTTDLPSRFIYPNHNFPNGV  
VIAY*****ALDFEDCGDIVNDLSLHQLPKEEIQTFCHPSRIQRWSLDKYAMGGITTFPTYQF  
QHFSEALTAPVDRIYFAGEYTAQAHGWDSTIKSGLR*****
```

**Figura 9. Sequências obtidas para as enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO por espectrometria de massas.** A marcação em amarelo indica o começo do N-terminal, sem o peptídeo sinal, e \* indica os gaps que não foram sequenciados.

Na análise por espectrometria de massas para BjussuLao-II, foram identificados 456 resíduos de aminoácidos do total de 502 resíduos da sequência usada como base (ATU85535.1), totalizando 91% de cobertura. Além disso, um total de 530 digestos foram sequenciados e destes fragmentos, 261 representavam sequências *de novo* e 94 apresentaram modificações pós-traducionais (**Figura 11A**). Para a análise da BmooLAAO, foram identificados 415 resíduos de aminoácidos dos 502 resíduos da sequência ATU85535.1, totalizando 83% de cobertura. E para esta enzima, foram sequenciados 315 digestos, dos quais, 81 fragmentos representavam sequências *de novo* e 62 apresentaram modificações pós-traducionais (**Figura 11B**).

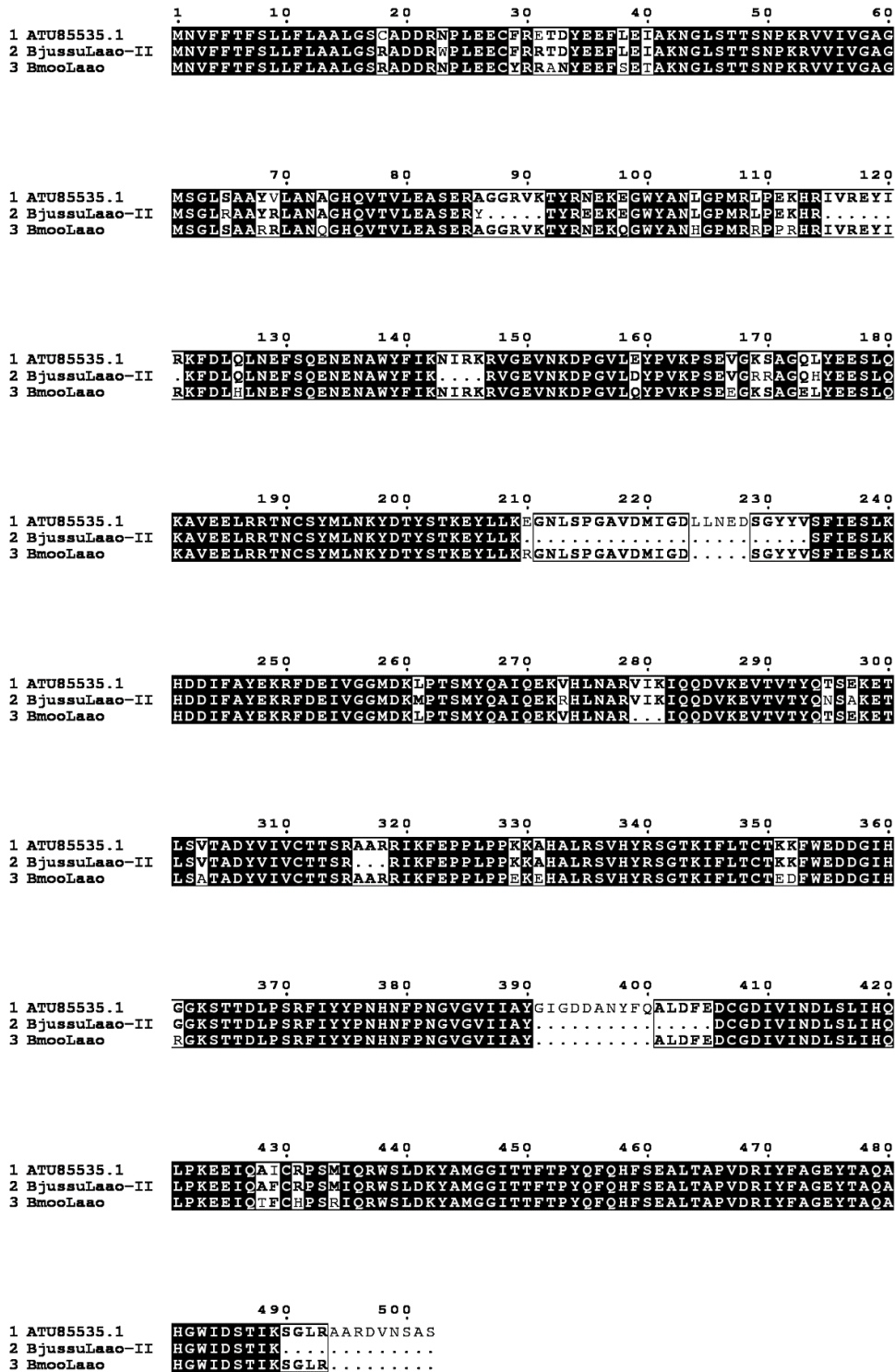


Figura 10. Alinhamento das sequências de BjussuLaao-II e BmooLaao-I comparadas com o depósito ATU85535.1. As caixas pretas representam os aminoácidos conservados. Os resíduos em preto são conservados em pelo menos duas sequências, enquanto resíduos não conservados são representados em cinza. O alinhamento foi realizado utilizando o programa MultAlin (CORPET, 1988).



**Figura 11. Sequência de novo das SV-LAOs purificadas usando como referência a sequência ATU85535.1 de *B. moojeni*. As figuras completas estão no Apêndice. **A:** BjussuLAO-II apresentou 94 modificações pós-traducionais. **B:** BmoLAO apresentou 62 modificações pós-traducionais.**

### 4.3. Análises *in silico*

Foi realizado o desenvolvimento da estrutura por modelagem molecular, da L-aminoácido oxidase referência ATU85535.1, de *Bothrops moojeni*, com o objetivo de comparar o sítio de ligação do FAD com as SV-LAOs BjussuLAO-II e BmooLAO. Para modelagem por homologia foi necessária a busca por potenciais modelos, e a estrutura da L-aminoácido oxidase de *Bothrops jararacussu* (ULLAH, 2012) foi selecionada; e a partir da estrutura primária da ATU85535.1 utilizada como *input* (Tabela 3) o modelo da estrutura quaternária foi gerado. Foi possível observar a presença das duas subunidades comumente encontradas em LAO (Figura 12). Através da sobreposição da proteína gerada com o modelo, foi possível estimar a região de interação do FAD (Figura 13) demonstrando os aminoácidos presentes nesse sítio. Todos os aminoácidos originados estão presentes tanto na referência ATU85535.1 quanto nas sequências de BjussuLAO-II e BmooLAO, com exceção da Arg89, Gly87 e Gly88 que não foram visualizados na BjussuLAO-II pois não foi possível obter os aminoácidos dessas posições. Essa sobreposição exibiu uma região bem conservada entre SV-LAOs, pois estava presente no modelo de *B. jararacussu* utilizado, na referência ATU85535.1, BjussuLAO-II e BmooLAO.

**Tabela 3. Sequência primária da SV-LAO utilizada como *input* para modelagem molecular por homologia (AMORIM et al., 2017).**

---

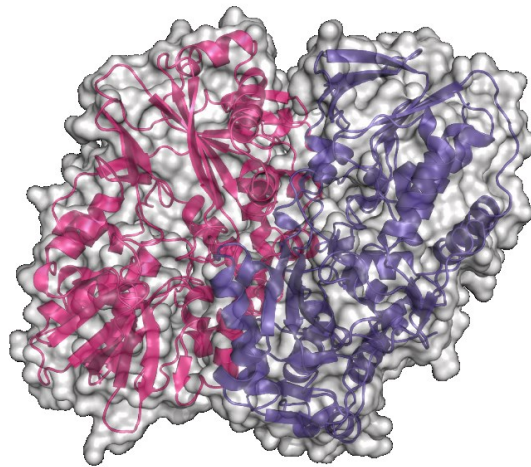
L-aminoacid oxidase, partial - *Bothrops moojeni* (GenBank: ATU85535.1)

---

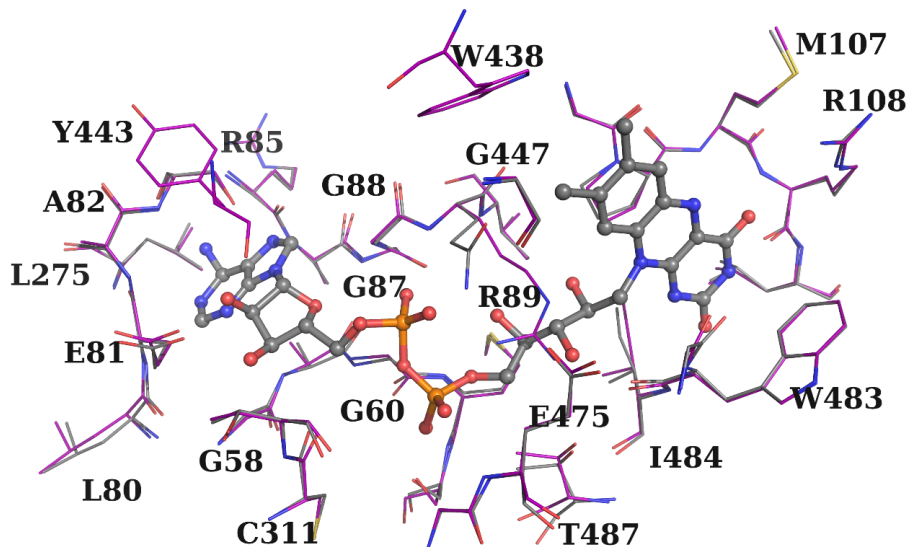
>ATU85535.1 L-aminoacid oxidase, partial [*Bothrops moojeni*] \*

MNVFFTFSLFLAALGSCADDRNPLEECFRET DYE EFLEIAKNGLSTTSNPKR VVIVGAGMSG  
LSAAYVLANAGHQVTVLEASERAGGRVKTYRNEKEGWYANLGPMRLPEKHRIVREYIRKFD  
LQLNEFSQENENAWYFIKNIRKRVGEV NKDPGVLEYPVKPSEVGKSAGQLYEESLQKAVEEL  
RRTNCSYMLNKYDTYSTKEYLLKEGNLSPGAVDMIGDLLNEDSGYYVSFIESLKHDDIFAYEK  
RFDEIVGGMDKLPTSMYQAIQEKVHLNARVIKIQQDVKEVTVTYQTSEKETLSVTADYVIVCT  
TSRAARRIKFEPPLPPKKAHALRSVHYRSGTKIFLTCTKKFWEDDGIHGGKSTTDLPSRFIYY  
PNHNF PNGVGVIIAYGIGDDANYFQALDFEDCGDIVINDLSLIHQLPKEEIQACRPSMIQRWS  
LDKYAMGGITTFPTYQFQHFSEALTAPVDRIYFAGEYTAQAHGWDSTIKSGLRAARDVNSAS

\* A marcação em cinza não faz parte da proteína gerada, enquanto que a marcação em verde define o início da proteína no modelo.



**Figura 12. Modelo da estrutura quaternária gerado por homologia para ATU85535.1 de *Bothrops moojeni*. Em rosa e roxo estão demonstradas as duas subunidades da SV-LAAO referência.**



**Figura 13. Principais aminoácidos envolvidos no bolsão de interação do cofator FAD das SV-LAAOs modelo *B. Jararacussu* e referência ATU85535. 1: Gly58, Ala59, Gly60, Met61, Ser62, Leu80, Glu81, Ala82, Ser83, Arg85, Ala86, Gly87, Gly88, Arg89, Val90, Gly105, Pro106, Met107, Arg108, Leu109, Leu275, Cys311, Thr312, Tyr443, Trp438, Gly447, Gly482, Trp483, Ile484, Thr487, Glu475, Gly474.**

#### **4.4. Avaliação do efeito citotóxico de BjussuLAAO-II e BmooLAAO sobre parasitos do gênero *Leishmania***

Com o intuito de avaliar a atividade das LAAOs botrópicas (BjussuLAAO-II e BmooLAAO) sobre as espécies de *L. (L.) amazonensis* e

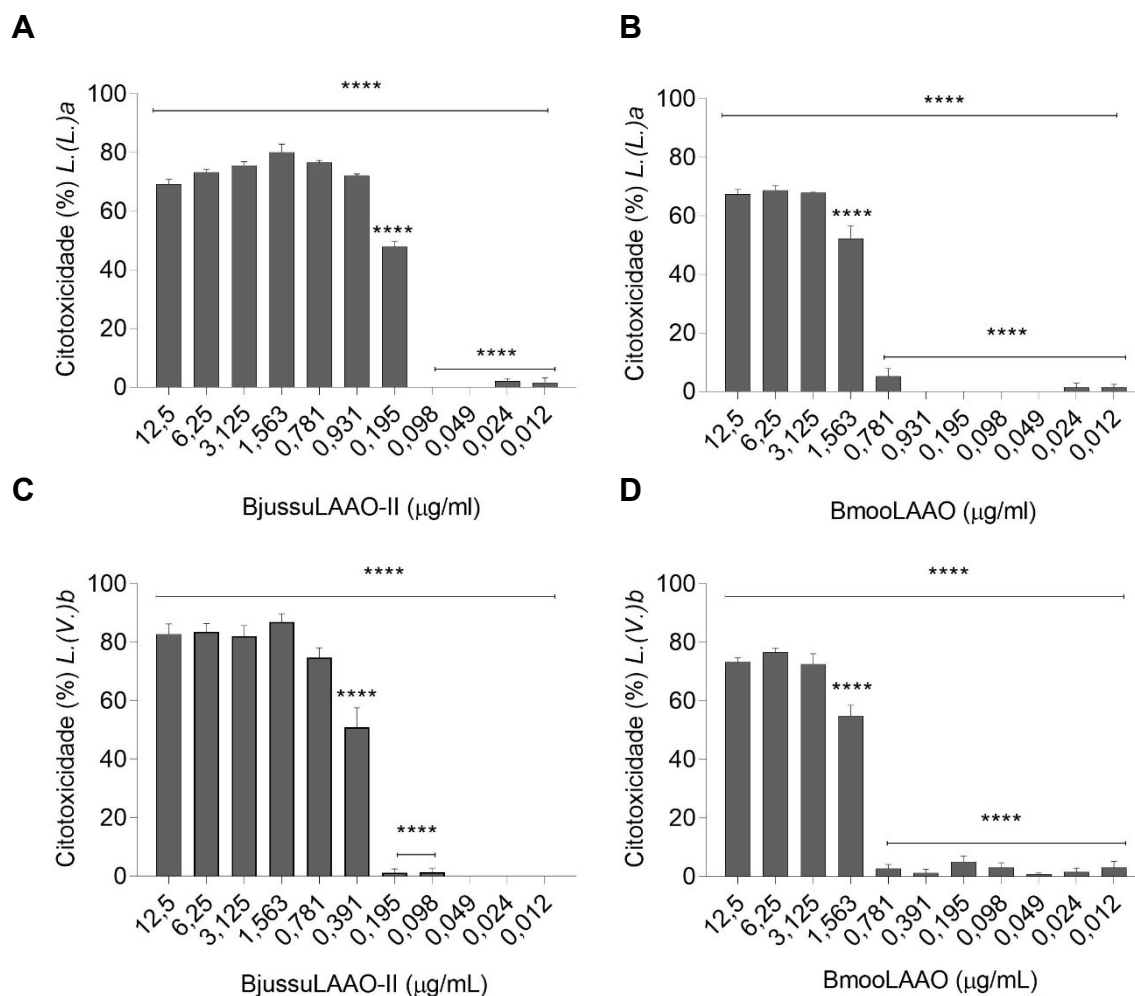
*L. (V.) braziliensis*, a citotoxicidade dos tratamentos foi mensurada através da atividade metabólica das células viáveis remanescentes.

Por meio do ensaio descrito por Mosmann (1983) com algumas modificações, foi possível perceber que as duas SV-LAAOs testadas apresentaram um alto potencial leishmanicida para *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, mesmo em baixas concentrações. No geral, as enzimas apresentaram o mesmo perfil de citotoxicidade com 3 momentos diferentes, no primeiro houve uma faixa de concentração com alta citotoxicidade, seguido de uma única concentração menos citotóxica, e por último, uma nova faixa com pouca ou nenhuma citotoxicidade. As duas faixas não apresentaram diferença estatística entre as concentrações, ressaltando que o intervalo com alta citotoxicidade, exibiu um *plateau* máximo de 80% (**Figura 14**).

Para a espécie *L. (L.) amazonensis*, no tratamento com a BjussuLAAO-II as seis primeiras concentrações apresentaram citotoxicidades entre 70-80% ( $p < 0,0001$ ) de 12,5 a 0,391  $\mu\text{g/mL}$ . A concentração de 0,195  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de matar aproximadamente 50% ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 14A**). As demais concentrações testadas não apresentaram citotoxicidade para os parasitos. No tratamento com a BmooLAAO, as concentrações de 12,5 a 3,125  $\mu\text{g/mL}$  inibiram aproximadamente 70% ( $p < 0,0001$ ) da viabilidade, enquanto que a concentração de 1,563  $\mu\text{g/mL}$  exibiu entre 50-60% ( $p < 0,0001$ ) de citotoxicidade (**Figura 14B**). As demais concentrações testadas não foram citotóxicas para a espécie.

Na espécie *L. (V.) braziliensis*, após 24h de tratamento, a BjussuLAAO-II foi capaz de manter a mesma citotoxicidade, próxima de 80% ( $p < 0,0001$ ), entre a faixa de concentrações de 12,5 a 0,781  $\mu\text{g/mL}$ . Além disso, a concentração de 0,391  $\mu\text{g/mL}$  foi capaz de apresentar uma toxicidade entre 50% e 60% ( $p < 0,0001$ ), enquanto que as demais concentrações não foram citotóxicas para os parasitos (**Figura 14C**). A enzima BmooLAAO reduziu consideravelmente a viabilidade dos parasitos, sem diferença significativa, nas três primeiras concentrações de 12,5, 6,25 e 3,125  $\mu\text{g/mL}$ , apresentando 70-80% ( $p < 0,0001$ ) de citotoxicidade. Este intervalo de concentrações exibiu uma diferença significativa para a

concentração de 1,563 µg/mL que foi capaz de apresentar uma toxicidade entre 50 e 60% ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 14D**). O restante das concentrações apresentou baixa citotoxicidade para a *L. (V.) braziliensis*.

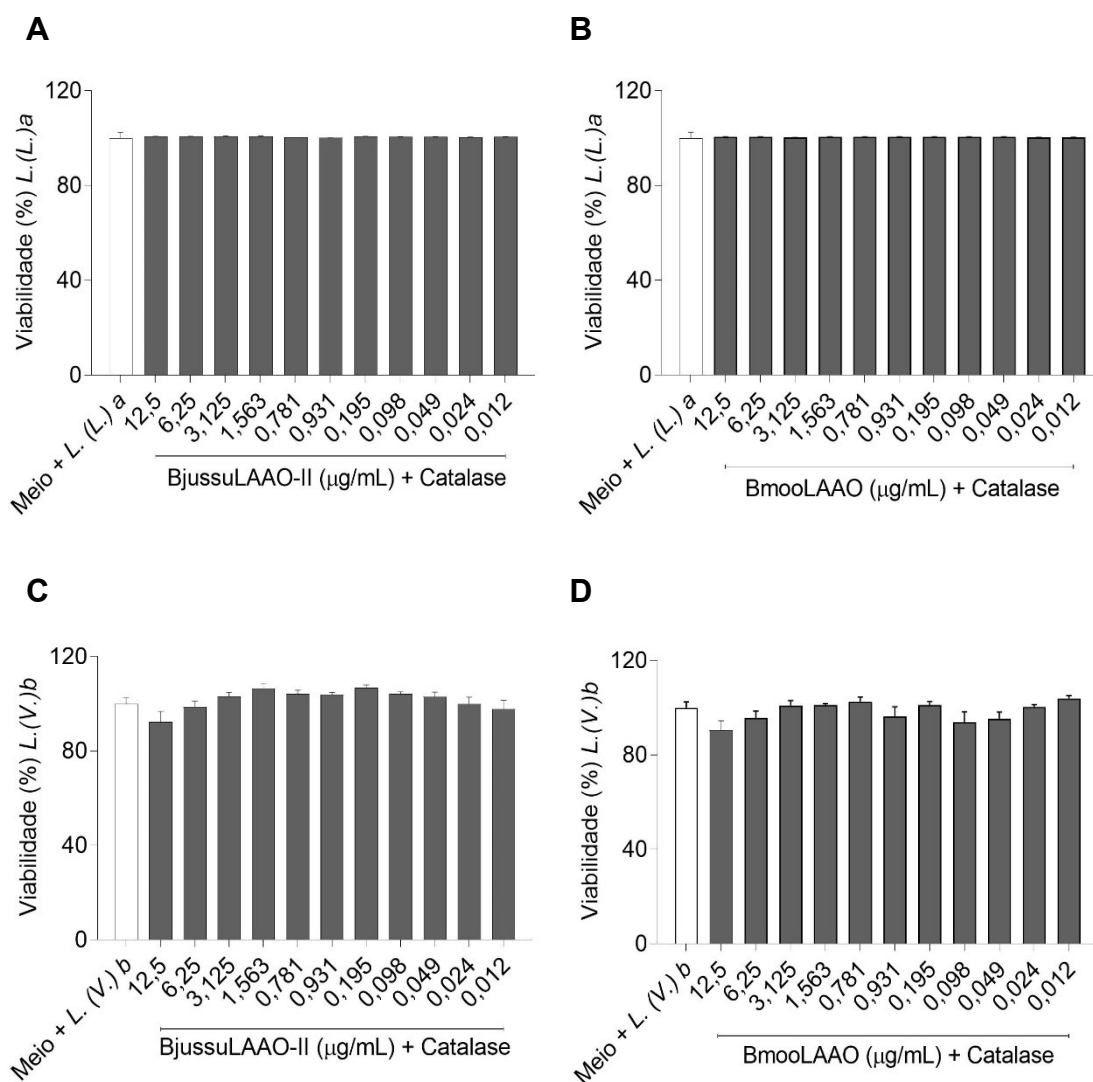


**Figura 14. Efeito citotóxico das SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO sobre os parasitos das espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*.** Foi realizada uma diluição seriada a partir de 12,5 µg/mL para cada enzima nas duas espécies, e após 24h de tratamento foi incubado o reagente MTT para metabolização por 3h. Posteriormente foi adicionado SDS 10% overnight e a leitura da absorbância foi feita no dia seguinte à 570 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0.0001$  (\*\*\*\*). **A:** *L. (L.) amazonensis* tratada com BjussuLAAO-II. **B:** *L. (L.) amazonensis* tratada com BmooLAAO. **C:** *L. (V.) braziliensis* tratada com BjussuLAAO-II. **D:** *L. (V.) braziliensis* tratada com BmooLAAO.

Com o objetivo de analisar se a ação citotóxica das LAAOs seria proveniente da formação da espécie reativa de oxigênio, peróxido de



hidrogênio ( $H_2O_2$ ), foram realizados ensaios de MTT na presença da enzima catalase, responsável pela degradação do peróxido em água e oxigênio. Observou-se que a catalase foi capaz de inibir completamente o efeito citotóxico das SV-LAAOs, tanto na espécie *L. (L.) amazonensis* (**Figura 15A e B**) quanto na *L. (V.) braziliensis* (**Figura 15C e D**). E, conforme as análises estatísticas realizadas, não houve diferença significativa ( $p < 0,05$ ) entre as concentrações testadas e o controle (meio com *Leishmania*), demonstrando que a espécie reativa de oxigênio,  $H_2O_2$ , tem um papel extremamente importante na citotoxicidade das enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO sobre os parasitos.



**Figura 15. Efeito citotóxico das SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO na presença de catalase sobre os parasitos das espécies *Leishmania Leishmania***

*amazonensis* e *Leishmania Viannia braziliensis*. Foi realizada uma diluição seriada a partir de 12,5 µg/mL para cada enzima nas duas espécies, e logo em seguida foram adicionados os parasitas com catalase. Após 24h de tratamento foi incubado o reagente MTT para metabolização por 3h, e posteriormente foi adicionado SDS 10% overnight. A leitura da absorbância foi feita no dia seguinte à 570 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes. **A:** *L. (L.) a* tratada com BjussuLAAO-II e catalase. **B:** *L. (L.) a* tratada com BmooLAAO e catalase. **C:** *L. (V.) b* tratada com BjussuLAAO-II e catalase. **D:** *L. (V.) b* tratada com BmooLAAO e catalase.

Os ensaios com MTT permitiram verificar a citotoxicidade de cada SV-LAAO sobre as espécies *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e *Leishmania (Viannia) braziliensis*, e a partir desses resultados foi possível selecionar concentrações que representassem diferentes citotoxicidades, com o objetivo de comparar o efeito de cada concentração das enzimas nos ensaios posteriores. Como o perfil foi o mesmo para as duas SV-LAAOs, foram escolhidas duas concentrações de BjussuLAAO-II e BmooLAAO que apresentaram alta e média citotoxicidades em cada espécie de *Leishmania* (**Tabela 4**). Como várias concentrações exibiram alta citotoxicidade sem diferença significativa em ambas as espécies, as concentrações selecionadas foram escolhidas de forma arbitrária. Coincidentemente, para a enzima BmooLAAO a mesma concentração apresentou citotoxicidade mediana nas duas espécies, contudo, a BjussuLAAO-II demonstrou ser mais citotóxica para a *L. (L.) amazonensis* do que para a *L. (V.) braziliensis*.

**Tabela 4. Concentrações selecionadas a partir dos ensaios de MTT sobre os parasitos para as duas SV-LAAOs botrópicas**

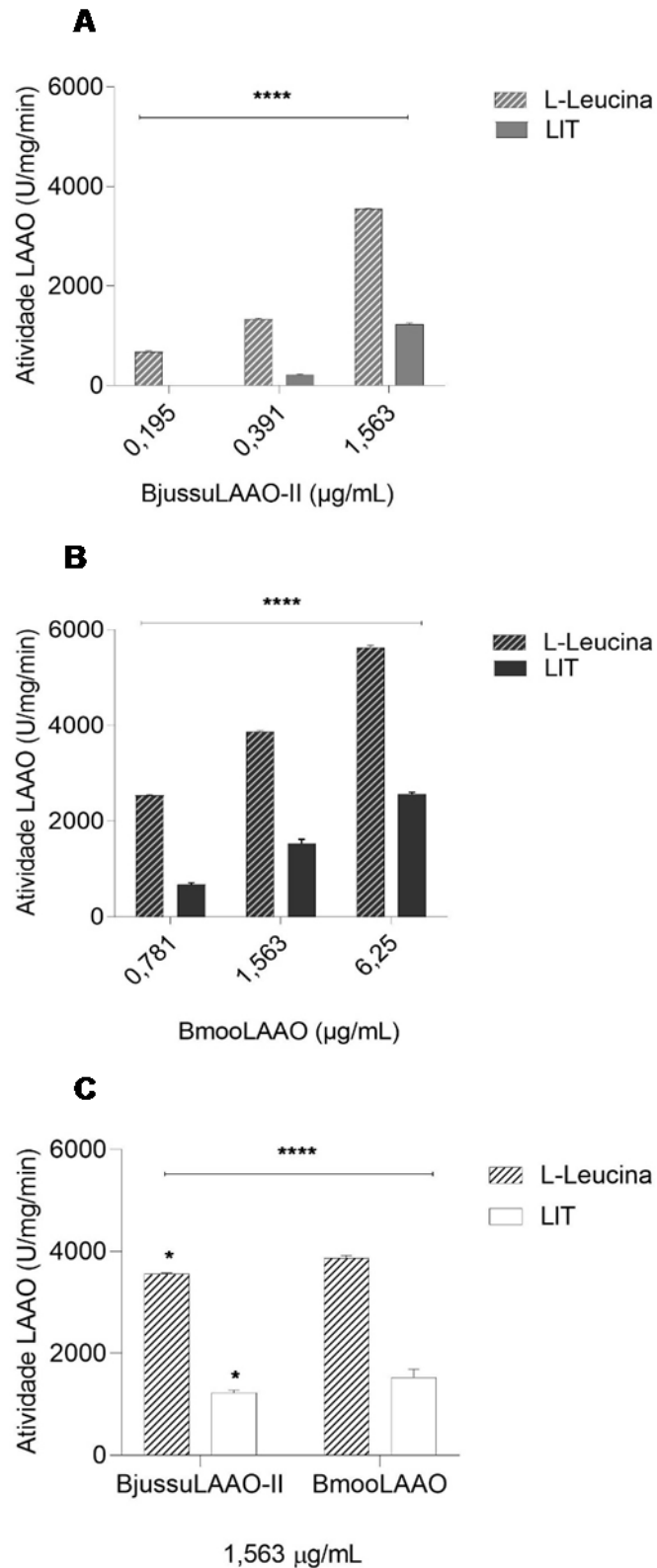
Espécie	BjussuLAAO-II (µg/mL)		BmooLAAO (µg/mL)		
	Alta	Média	Alta	Média	Outras
<i>L. (L.) a</i>	1,563	0,195	6,25	1,563	-
<i>L. (V.) b</i>	1,563	0,391	6,25	1,563	0,781

#### 4.5. Quantificação de atividade LAAO específica utilizando como substrato L-leucina e meio LIT completo

Para verificar a quantidade de peróxido produzida nas concentrações selecionadas, e se o  $H_2O_2$  produzido pelas SV-LAAOs seria derivado da catálise extracelular aos parasitos, foi realizada uma atividade específica de LAAO com L-leucina e com meio LIT completo. Foi possível observar que independente do substrato utilizado, a produção de peróxido era crescente à medida que a concentração de SV-LAAO aumentava, contudo foi observado que as LAAOs produziam mais  $H_2O_2$  quando incubadas com o aminoácido L-leucina ( $p < 0,0001$ ), apresentando alta atividade.

Quando as enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO foram incubadas com o meio LIT completo, utilizado para cultivo dos parasitos, a atividade diminuiu drasticamente ( $p < 0,0001$ ) (**Figura 16A e B**). Além disso, também foi possível visualizar que as maiores concentrações das SV-LAAOs utilizadas no meio LIT (1,563 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  para BjussuLAAO-II e BmooLAAO, respectivamente), não apresentaram diferença estatística com duas concentrações menores incubadas com L-leucina (0,391  $\mu\text{g/mL}$  BjussuLAAO-II e 0,781  $\mu\text{g/mL}$  BmooLAAO) (**Figura 16A e B**). Esse resultando indica que as LAAOs botrópicas estudadas, garantem sua toxicidade para os parasitos produzindo peróxido através de diferentes substratos.

Além disso, a concentração igual de BjussuLAAO-II e BmooLAAO (1,563  $\mu\text{g/mL}$ ) teve uma pequena diferença estatística ( $p < 0,1$ ), quando incubada com L-leucina e meio LIT completo, indicando que a quantidade de produto formada, é bem próxima uma da outra independente do substrato (**Figura 16C**).



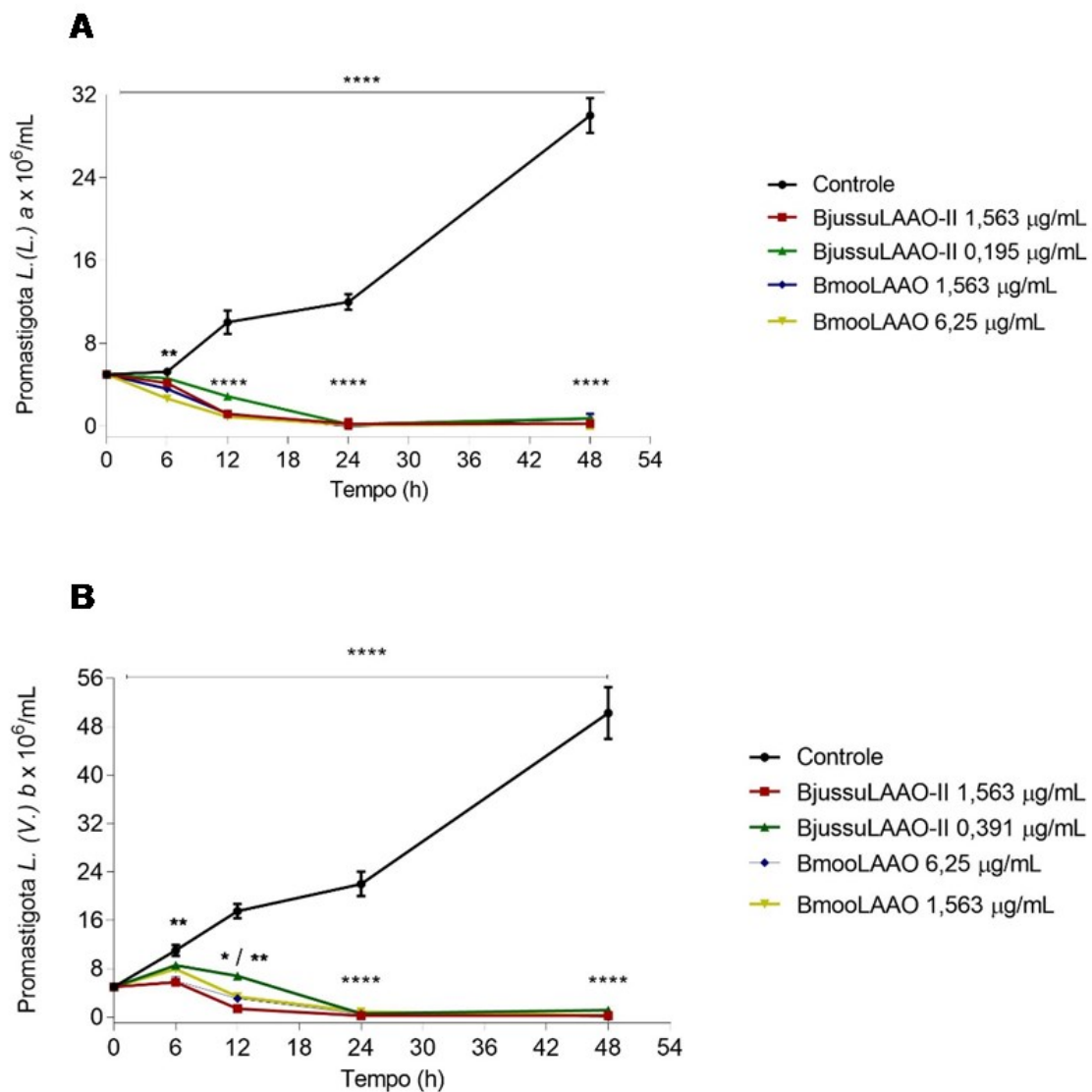
**Figura 16. Atividade específica de LAAO com as concentrações selecionadas no MTT utilizando L-leucina e meio LIT completo como substrato. As concentrações de 0,195, 0,391, 0,781, 1,563 e 6,25  $\mu\text{g/mL}$  foram incubadas com os substratos L-leucina e meio LIT completo durante 30 minutos. Após a paragem da reação as amostras foram**

lidas em espectrofotômetro à 490 nm. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,1$  (\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Concentrações citotóxicas de BjussuLAAO-II incubadas com o aminoácido e com meio LIT. **B:** Concentrações citotóxicas de BmooLAAO incubadas com o aminoácido e com meio. **C:** comparação da atividade de LAAO entre BjussuLAAO-II e BmooLAAO com L-leucina e meio LIT completo.

#### **4.6. Avaliação dos efeitos de BjussuLAAO-II e BmooLAAO na proliferação dos parasitos do gênero *Leishmania***

Com o objetivo de comparar as atividades das SV-LAAOs na proliferação dos parasitos das duas espécies de *Leishmania*, foi constatado que os tratamentos com todas as concentrações testadas de BjussuLAAO-II e BmooLAAO, promoveram um efeito antiproliferativo dependente do tempo e estatisticamente significativo em relação ao controle negativo nas duas espécies de *Leishmania*.

Para as duas espécies de parasitos, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram obtidos o mesmo efeito, no qual com 6 e 12h de tratamento já foi possível observar diferença significativa em relação ao controle, principalmente com as concentrações de 1,563 e 6,25 µg/mL das duas SV-LAAOs. Após 24h de incubação com as duas enzimas, todas as concentrações de BjussuLAAO-II e BmooLAAO inibiram completamente a proliferação dos parasitos de ambas as espécies, mantendo esse efeito por até 48h (**Figura 17A e B**).

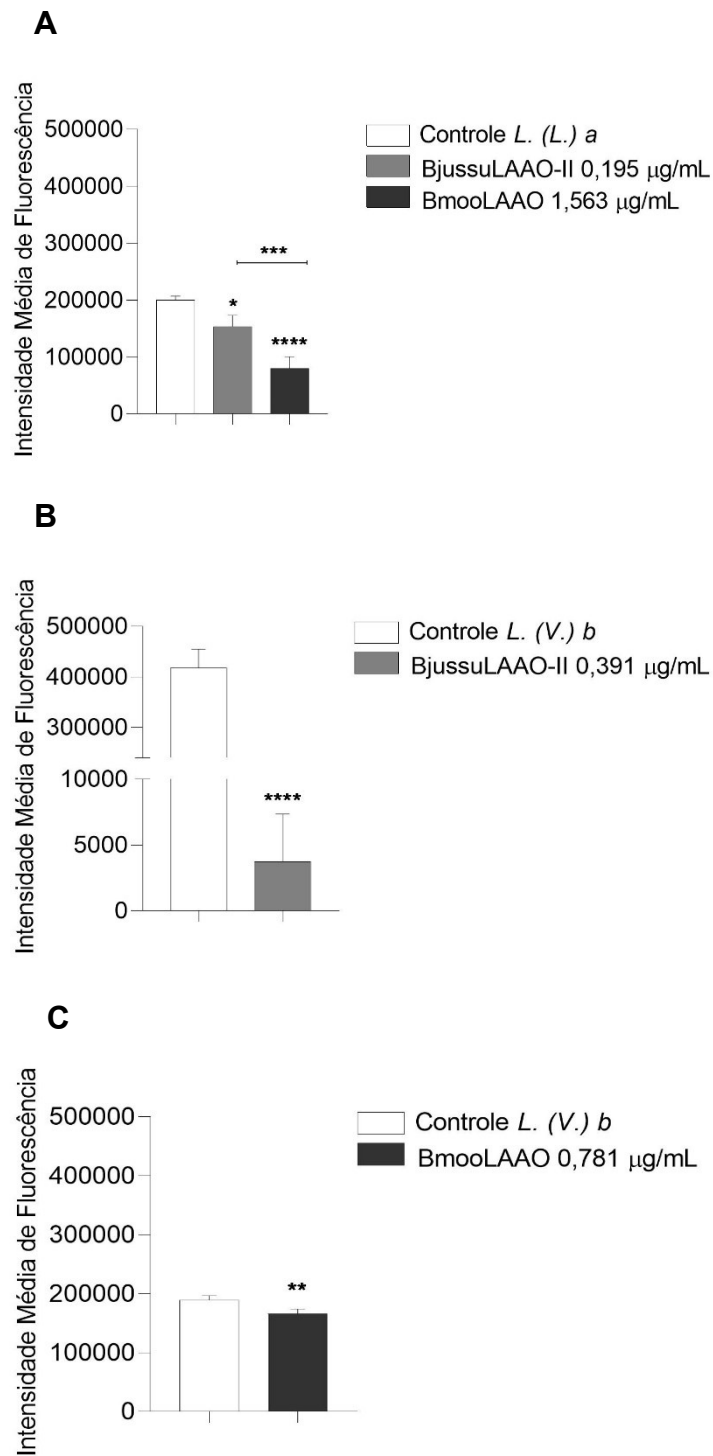


**Figura 17. Efeito antiproliferativo produzido pelas SV-LAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO nas espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.** Parasitos das duas espécies foram tratados com diferentes concentrações das enzimas SV-LAOs. Alíquotas foram coletadas em diferentes tempos de incubação, 6, 12, 24 e 48h, e parasitos foram contados na câmara de Neubauer. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,1$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Parasitos *L. (L.) amazonensis* tratados com concentrações de 0,195 e 1,563 g/mL de BjussuLAAO-II, e 1,563 e 6,25 µg/mL de BmooLAAO. **B:** Parasitos *L. (V.) braziliensis* tratados com concentrações de 0,391 e 1,563 g/mL de BjussuLAAO-II, e 1,563 e 6,25 µg/mL de BmooLAAO.

#### 4.7. Avaliação da alteração do potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dos parasitos promovida pela BjussuLAAO-II e BmooLAAO

Com o intuito de verificar o efeito das SV-LAAOs no potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) dos parasitos, formas promastigota controle e tratadas foram incubadas com o corante fluorescente Rh 123, que é capaz de entrar em mitocôndrias que apresentam polarização na membrana plasmática. Após 24h de tratamento, a análise por citometria de fluxo demonstrou que na espécie *L. (L.) amazonensis* os parasitos tratados com 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO apresentaram maior redução na fluorescência do que os promastigotas incubados com 0,195  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II, quando em comparação ao não tratado. Também foi observado diferença estatística entre as SV-LAAOs (**Figura 18A**).

Para a espécie *L. (V.) braziliensis*, promastigotas tratados com 0,391  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II tiveram uma redução significativa da fluorescência do corante Rh 123, quando comparado com o controle (**Figura 18B**). Entretanto, no tratamento de 24h com BmooLAAO 1,563  $\mu\text{g/mL}$  foi observado uma insuficiência no número de parasitos viáveis pela quantificação do número de eventos mínimos requisitados na análise por citometria (dado não mostrado), por esse motivo um novo ensaio foi realizado com 0,781  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO (**Tabela 4**), e após 24h foi possível perceber uma pequena alteração no  $\Delta\Psi_m$  dos parasitos em relação ao grupo controle ( $p < 0,01$ ) (**Figura 18C**).



**Figura 18. Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) induzida pelas SV-LAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO.** Parasitos das espécies *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* foram tratados com as enzimas SV-LAOs por 24h e posteriormente incubados com o corante Rh 123. A análise da fluorescência foi realizada através do citômetro de fluxo com pelo menos 10 mil eventos. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,1$  (\*),  $p < 0,01$  (\*\*),  $p < 0,001$  (\*\*\*) e  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Tratamento com as concentrações 0,195 µg/mL de BjussuLAAO-II e



1,563 µg/mL de BmooLAAO na espécie *L. (L.) amazonensis*. **B:** Tratamento com a concentração 0,391 µg/mL de BjussuLAAO-II na espécie *L. (V.) braziliensis*. **C:** Tratamento com a concentração 0.781 µg/mL de BmooLAAO na espécie *L. (V.) braziliensis*.

#### **4.8. Quantificação de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular produzidas por parasitos tratados com as SV-LAAOs BjussuLAAO-II e BmooLAAO**

Com o intuito de verificar e comparar a produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) pelos parasitos *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, induzida pelo tratamento com as SV-LAAOs, promastigotas foram incubados com a sonda CM-H2DCFDA que funciona como um indicador geral de estresse oxidativo.

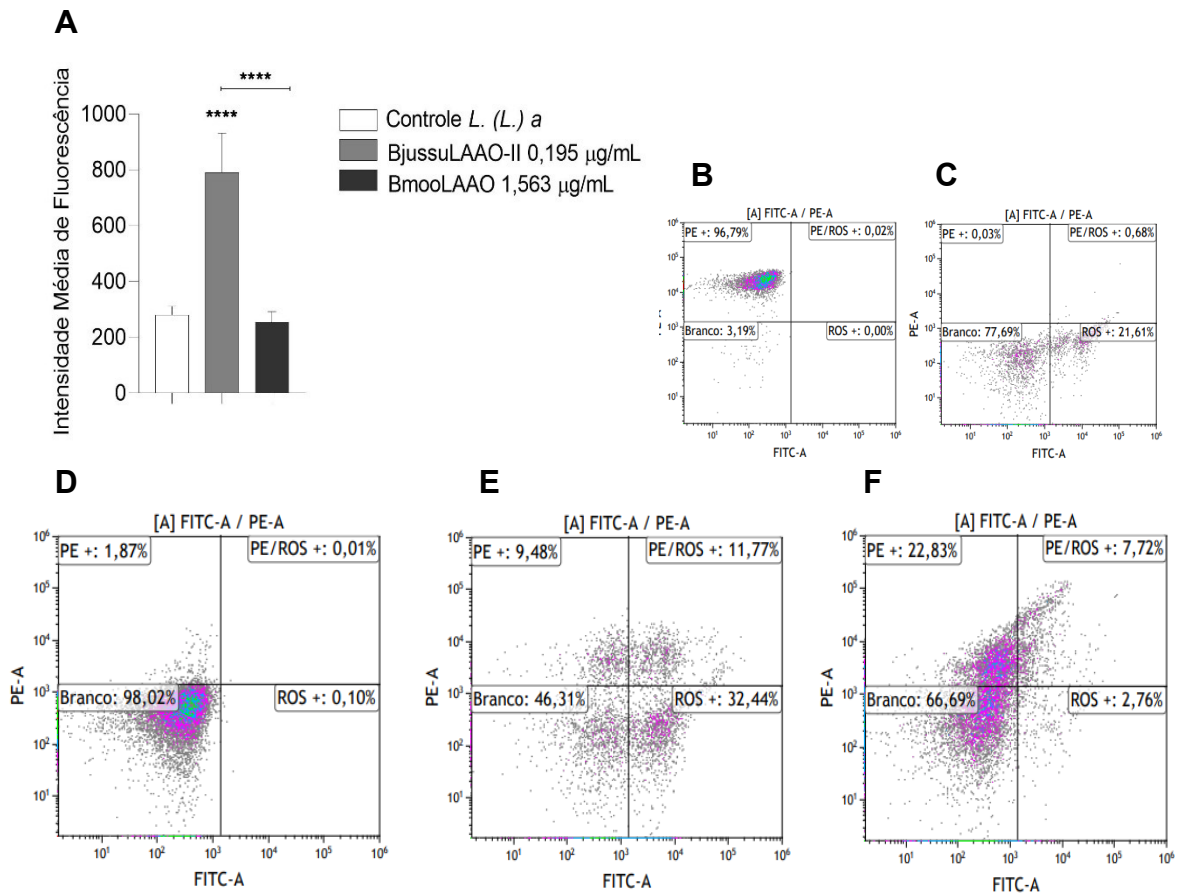
Formas promastigota de *L. (L.) amazonensis* incubados com 0,195 µg/mL de BjussuLAAO-II demonstraram um grande aumento na fluorescência quando comparadas com o controle ( $p < 0,0001$ ) enquanto que o tratamento com 1,563 µg/mL de BmooLAAO não apresentou diferença estatística em relação ao não tratado, com isso, também houve uma diferença significativa ( $p < 0,0001$ ) entre as SV-LAAOs estudadas, BjussuLAAO-II e BmooLAAO (**Figura 19A**). Este resultado também pôde ser visualizado nos gráficos de quadrantes dos grupos não tratado e tratados com SV-LAAOs (**Figura 19D, E e F**) quando também comparados com os controles PI e ROS (**Figura 19B e C**).

Pôde-se observar que os parasitos não tratados e incubados com PI e ROS, separadamente, não marcaram para o iodeto de propídeo e nem para a sonda CM-H2DCFDA, de produção de espécies reativas de oxigênio, enquanto que nos tratamentos com BjussuLAAO-II e BmooLAAO houve grandes mudanças nos perfis das populações. Alguns parasitos marcaram PI, outros não tiveram nenhuma marcação, uma população marcou tanto para PI quanto para sonda CM-H2DCFDA, e uma população significativa, somente no tratamento com BjussuLAAO-II, marcou para EROs, demonstrando um perfil completamente diferente do controle e também entre as SV-LAAOs. Portanto, é possível inferir que 0,195 µg/mL

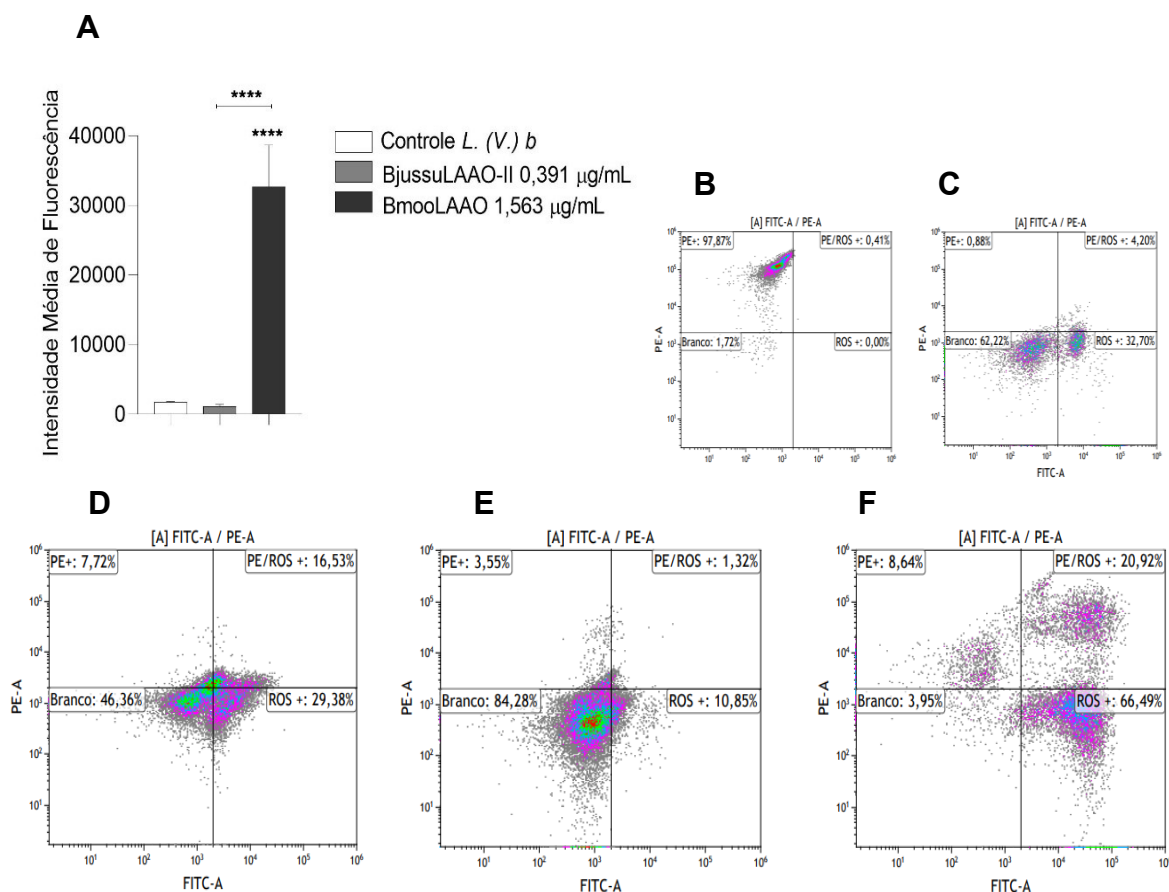
de BjussuLAAO-II foi capaz de produzir um estresse oxidativo nos parasitos com apenas 6h de tratamento, culminando no aparecimento de 4 populações diferentes.

Os parasitos *L. (V.) braziliensis*, ao contrário da outra espécie, apresentaram uma grande diferença significativa na incubação com 1,563 µg/mL de BmooLAAO ( $p < 0,0001$ ), ao passo que 0,391 µg/mL de BjussuLAAO-II não apresentou nenhuma distinção do não tratado, além disso, também houve diferença estatística ( $p < 0.0001$ ) entre as SV-LAAOs (**Figura 20A**). Este resultado também pôde ser observado nos gráficos de quadrantes não tratado e tratados com SV-LAAOs (**Figura 20D, E e F**) quando comparados com os controles PI e EROs (**Figura 20B e C**).

Pôde-se observar que os parasitos não tratados e incubados com PI e EROs, separadamente, marcaram tanto para o iodeto de propídeo e quanto para produção de espécies reativas de oxigênio. Nos tratamentos com enzimas estudadas houveram mudanças nos perfis das populações, nas quais a maior parte da população dos tratados com BjussuLAAO-II não marcaram nada, enquanto que poucos parasitos não tiveram marcação nas populações dos tratados com BmooLAAO; alguns promastigotas marcaram PI; uma população marcou tanto para PI quanto para EROs; e a maior população, marcou para EROs, demonstrando um perfil completamente diferente do controle e entre as SV-LAAOs. A concentração de 1,563 µg/mL de BmooLAAO foi capaz de produzir um estresse oxidativo nos parasitos com apenas 6h de tratamento, culminando no aparecimento de 3 populações diferentes.



**Figura 19. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por parasitos da espécie *L. (L.) amazonensis*, induzida pelas SV-LAOs.** Promastigotas foram incubados com as enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO por 6h e posteriormente incubados com a sonda CM-H2DCFDA. A análise da fluorescência foi realizada através do citômetro de fluxo com pelo menos 10 mil eventos. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Gráfico das medianas de fluorescência dos não tratado, *L. (L.) amazonensis* tratada com 0,195 µg/mL de BjussuLAAO-II e com 1,563 µg/mL de BmooLAAO. **B:** Gráfico de quadrante do controle PI. **C:** Gráfico de quadrante do controle EROs. **D:** Gráfico de quadrante do não tratado. **E:** Gráfico de quadrante do tratamento com 0,195 µg/mL de BjussuLAAO-II. **F:** Gráfico de quadrante do tratamento com 1,563 µg/mL de BmooLAAO.



**Figura 20. Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) por parasitos da espécie *L. (V.) braziliensis*, induzida pelas SV-LAOs.** Promastigotas foram incubados com as enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO por 6h e posteriormente incubados com a sonda CM-H2DCFDA. A análise da fluorescência foi realizada através do citômetro de fluxo com pelo menos 10 mil eventos. O teste foi realizado em triplicata em três experimentos independentes.  $p < 0,0001$  (\*\*\*\*). **A:** Gráfico das medianas de fluorescência dos não tratado, *L. (V.) braziliensis* tratada com 0,391  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II e com 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO. **B:** Gráfico de quadrante do controle PI. **C:** Gráfico de quadrante do controle EROs. **D:** Gráfico de quadrante do não tratado. **E:** Gráfico de quadrante do tratamento com 0,391  $\mu\text{g/mL}$  de BjussuLAAO-II. **F:** Gráfico de quadrante do tratamento com 1,563  $\mu\text{g/mL}$  de BmooLAAO.

## 5. DISCUSSÃO

Inúmeros estudos de caracterização biológica de LAOs de diferentes gêneros de serpentes já evidenciaram o potencial farmacológico dessas proteínas e abriram a possibilidade para elas servirem de

ferramentas para o desenvolvimento de novos fármacos mais eficazes no combate de doenças bacterianas, parasitárias, virais e de diferentes tipos de câncer (COSTA et al., 2014, 2015, 2018; DU; CLEMETSON, 2002; IZIDORO et al., 2014). Nesse contexto, o principal objetivo desse trabalho foi avaliar comparativamente os danos causados por duas SV-LAAOs botrópicas sobre diferentes espécies de *Leishmania*.

Inicialmente o intuito era trabalhar com SV-LAAOs já isoladas, caracterizadas e descritas na literatura, como a BjussuLAAO-II, isolada da peçonha de *B. jararacussu*, e a BmooLAAO-I, isolada da peçonha de *B. moojeni*. Com o objetivo de isolar a BjussuLAAO-II, foi reproduzido o processo de purificação descrito por Carone et al., (2017), no qual a enzima de interesse com massa molecular de 60 kDa, foi obtida com alto grau de pureza e alta atividade enzimática (3481,17 U/mg/min), em apenas 3 etapas cromatográficas (exclusão molecular, interação hidrofóbica e afinidade).

Para o isolamento da BmooLAAO-I (64,9 kDa) foram seguidos os passos cromatográficos descrito por Stábeli e colaboradores (2007), iniciando com uma coluna de troca iônica CM-Sepharose, seguida por uma coluna de interação hidrofóbica Phenyl-Sepharose, mas, não se obteve sucesso nesse isolamento. Entretanto, utilizando a metodologia proposta para a BjussuLAAO-II, foi obtida uma SV-LAAO com alto grau de pureza, massa molecular de ~ 45 kDa (detectada por SDS-PAGE) e alta atividade enzimática (4924,77 U/mg/min); a qual foi chamada de BmooLAAO.

O fato de não conseguir isolar a BmooLAAO-I já descrita, pode estar relacionado ao conteúdo proteico da peçonha utilizada nos processos de purificação. Sabe-se que a composição da peçonha de serpentes da mesma espécie pode apresentar grande variação por causa de vários fatores, como a região em que a serpente vive e conseqüentemente sua alimentação, assim como a idade, sexo, entre outros (BJARNASON & FOX, 1995; AMORIM et al., 2018).

Vários estudos publicados mostram o isolamento de SV-LAAOs pela combinação de diferentes técnicas cromatográficas rápidas e eficientes, sendo que a maioria dos procedimentos inicia-se com uma separação baseada no tamanho molecular seguida por cromatografia de troca-iônica

ou de afinidade (IZIDORO et al., 2014). Outras SV-LAAOs já foram purificadas, por estratégia semelhantes. Costal-Oliveira et al., (2019) purificou uma SV-LAAO de *Bothrops atrox* também por meio de três passos: exclusão molecular em Sephadex S-200, troca iônica em DEAE-Sepharose e afinidade em HiTrap Heparin. A SV-LAAO BM-Apotxin da peçonha de *Bungarus multicinctus* foi purificada por exclusão molecular em Sephadex G-75 e troca iônica em coluna Q-FF (LU et al., 2018); a MipLAAO da peçonha de *Micrurus mipartitus* passou por múltiplas cromatografias de exclusão molecular para ser isolada (REY-SUÁREZ et al., 2018). A LAAOcdt de *Crotalus durissus terrificus* foi isolada em apenas dois passos, uma exclusão molecular em Sephadex G-75 e interação hidrofóbica em PhenylSepharose FF (TEIXEIRA et al., 2016); a Bpic-LAAO de *Bothrops pictus* também foi obtida após duas cromatografias, uma exclusão molecular em Sephadex G-100 e troca iônica em CM Sephadex C-50 (LAZO et al., 2017).

Os dados de purificação descritos acima, nos mostram as inúmeras possibilidades de combinações de métodos cromatográficos que podem ser feitas para o isolamento de SV-LAAOs. Entretanto, é importante buscar um método que utilize o menor número de etapas, pois as LAAOs são enzimas extremamente instáveis, e podem perder sua atividade ao longo do processo de purificação.

As SV-LAAOs geralmente são homodiméricas, com massas moleculares variando entre 120-150 kDa e quando monômeros, entre 50-70 kDa, e como previamente descrito, BjussuLAAO-II corresponde a 0,3% da peçonha total, e apresentou massa de 60 kDa além de pI próximo de 4,9 (CARONE et al., 2017). A BmooLAAO, apresentou uma massa molecular um pouco maior que 45 kDa na análise de SDS-PAGE à 12,5%, contudo é necessário realizar um estudo sobre a massa intacta dessa enzima, para uma melhor caracterização e análise.

Apesar da BjussuLAAO-II já ter sido descrita na literatura, o sequenciamento além da porção N-terminal desta enzima ainda não tinha sido demonstrado. A espectrometria de massas permitiu a obtenção de uma maior cobertura dessa molécula e uma melhor análise comparativa das estruturas primárias. O sequenciamento *de novo* das SV-LAAOs

apresentou grande diferença nos perfis pós-traducionais, exibindo 94 e 62 modificações para BjussuLAAO-II e BmooLAAO, respectivamente.

As modificações pós-traducionais contribuem significativamente para vários aspectos funcionais das proteínas, estando envolvidas com a modulação de funções como metabolismo, transdução de sinal, estabilidade e interação proteína-proteína. Fosforilações, glicosilações, metilações, acetilações, amidações, entre outras, são algumas das transformações que podem ocorrer por meio de ligações covalentes de porções químicas a determinados resíduos de aminoácidos (AMORIM et al., 2019; DUAN; WALTHER, 2015).

A similaridade entre as SV-LAAOs foi claramente observada pelo alinhamento, tanto entre as enzimas deste trabalho (91,59%), quanto em relação à sequência referência ATU85535.1 (96,2% com BjussuLAAO-II e 93,4% com BmooLAAO), demonstrando que mesmo entre espécies diferentes de serpente, existe grande semelhança entre essas moléculas. Além disso, Carone et al. (2017) já havia comparado a porção N-terminal da BjussuLAAO-II com outras LAAOs descritas, demonstrando maior similaridade entre as espécies do gênero *Bothrops*. Estudos sobre as relações evolutivas das LAAOs culminaram em uma árvore filogenética, mostrando que na história evolucionária dessas enzimas, SV-LAAOs de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops moojeni* são estritamente relacionadas evolutivamente, compartilhando origens em comum com as espécies pertencentes ao gênero *Bothrops* (LAZO et al., 2017; RODRIGUES et al., 2009).

Além da identidade de 93,4% com a sequência referência ATU85535.1, também foi possível comparar a BmooLAAO purificada (presente trabalho) com a BmooLAAO-I descrita por Stábili et al. (2007) depositada no NCBI (GI: 82127389). A análise comparativa entre as duas LAAOs exibiu identidade de 91,6% no alinhamento, inferindo que a LAAO isolada de *B. moojeni* neste trabalho é uma isoforma encontrada na peçonha.

As informações na literatura descrevem que, em geral, SV-LAAOs são purificadas utilizando estratégias semelhantes e envolvendo processos cromatográficos similares (cromatografias de exclusão molecular,

geralmente seguidas de interação hidrofóbica, podendo ter passos em colunas de afinidade) (IZIDORO et al., 2014); e ainda, que em peçonhas de serpentes podem coexistir enzimas ácidas, neutras e básicas, podendo exibir propriedades farmacológicas diferentes, portanto isoformas de enzimas são comumente encontradas (CARONE et al., 2017; IZIDORO et al., 2014). No próprio estudo proteômico da peçonha de *B. jararacussu* foram encontradas sete SV-LAOs com ponto isoelétricos diferentes (CORREA-NETTO et al., 2010).

A modelagem molecular da referência ATU85535.1 possibilitou a comparação do sítio de ligação do FAD com BjussuLAAO-II e BmooLAAO, demonstrando que essa região é conservada entre as SV-LAOs. Segundo Ullah et al., (2012) na análise da LAAO de *B. jararacussu* utilizada como modelo para modelagem da ATU85535.1, foi visualizado que o domínio de ligação FAD localiza-se na fenda formada por domínios de cofatores e substratos, altamente conservada. A coenzima FAD é estabilizada por interações de hidrogênio e Van der Waals envolvendo vários resíduos de aminoácidos. A estrutura da LAAO de *Caloselasma rhodostoma*, descrita por Moustafa et al., (2006) demonstrou que essa enzima é formada por três domínios, um de ligação ao FAD, de ligação ao substrato e um domínio helicoidal.

SV-LAOs são geralmente glicoproteínas que podem apresentar sítios de glicosilações, variando a quantidade de glicanos em suas estruturas (DU; CLEMETSON, 2002; GUO et al., 2012). Os carboidratos estão ligados às LAOs por ligações N-glicosídicas e podem ser encontrados, glicanos como N-acetilglucosamina, fucose, manose, galactose e ácido siálico (ALI et al., 1999), que podem contribuir para modulação de propriedades físico-químicas, e ainda para estabilidade da molécula (COSTA et al., 2018; IZIDORO et al., 2014).

Embora estudos descritos na literatura demonstrem que o peróxido de hidrogênio gerado pode contribuir para os efeitos biológicos das LAOs, é possível que glicosilações presentes nestas enzimas também contribuam para este processo, através da interação da porção N-glicanabissialilada com estruturas presentes em superfícies celulares (ANDE et al., 2008; DU; CLEMETSON, 2002; SUHR; KIM, 1996). Nas análises dos



eletroferogramas de sequenciamento da BjussuLAAO-II foi possível identificar 2 sítios de glicosilações (COSTA et al., 2018). No entanto, estudos de modificações pós-traducionais deverão ser realizados para a melhor caracterização da BmooLAAO identificada no presente trabalho.

Vários estudos já reportaram que SV-LAAOs possuem diversos efeitos biológicos, entre eles atividades microbidas e antiparasitárias (COSTA et al., 2014; GUO et al., 2012; HELENO et al., 2017). Nos tratamentos com as SV-LAAOs, BjussuLAAO-II e BmooLAAO, baixas concentrações exibiram grande potencial citotóxico em *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, exibindo um perfil com 3 momentos distintos apresentado por ambas enzimas. Com isso, foi possível a obtenção de concentrações com diferentes citotoxicidades (**Tabela 4**). Foi observado um comportamento distinto entre as SV-LAAOs botrópicas, indicando que a BjussuLAAO II é mais citotóxica do que a BmooLAAO. Além disso, as concentrações com intervalo de 50-60% de citotoxicidade foram diferentes para espécies somente no tratamento com BjussuLAAO-II (0,195 µg/mL para *L. (L.) amazonensis* e 0,391 µg/mL *L. (V.) braziliensis*), enquanto que não mudou para BmooLAAO (1,563 µg/mL); indicando que além da alteração da atividade entre as SV-LAAOs botrópicas, também existe uma diferente susceptibilidade das espécies de *Leishmania* à enzima BjussuLAAO-II.

Até o momento, não há muitas informações de como as SV-LAAOs agem sobre as diferentes células, porém, essa variação é constantemente observada nos ensaios de citotoxicidade com essas enzimas. As espécies de *Leishmania* apresentam diferentes susceptibilidades em relação à diferentes SV-LAAOs isoladas, e em geral são inibidas por catalase, como a SV-LAAO da peçonha de *B. moojeni* (TEMPONE et al., 2001), BpirLAAO-I da peçonha de *B. pirajai* (IZIDORO et al., 2006), BmooLAAO-I de *B. moojeni* (STÁBELI et al., 2007), BjussuLAAO-I de *B. jararacussu* (FRANÇA et al., 2007), Bp-LAAO de *B. pauloensis* (RODRIGUES et al., 2009), BtroxLAAO de *B. atrox* (DE MELO ALVES PAIVA et al., 2011) e CR-LAAO de *Caloselasma rhodostoma* (COSTA et al., 2015).

A atividade específica de LAAO é determinada através de um ensaio com peroxidase que para conseguir oxidar o substrato OPD, consome o

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido pela enzima. Conseqüentemente, um radical catiônico é gerado, permitindo a identificação por meio de leitura em espectrofotômetro entre 380 e 492 nm. Os aminoácidos hidrofóbicos são preferidos pelas LAAOs, e nesta atividade o substrato comumente utilizado para geração do peróxido, é a L-leucina (DU; CLEMETSON, 2002; IZIDORO et al., 2014; MOUSTAFA et al., 2006). Em estudos anteriores, Costa et al., (2018) demonstraram que BjussuLAAO-II e BmooLAAO-I são altamente estáveis e ainda apresentaram alta afinidade ( $k_{cat}/K_m$ ) pelo aminoácido L-leucina, com valores de 23.500 e 44.326 respectivamente. Apesar de ainda não ter a caracterização cinética da BmooLAAO deste trabalho, essa enzima também apresentou alta atividade específica de LAAO.

As análises realizadas por meio da atividade específica de LAAO com as concentrações selecionadas pelo MTT (**Tabela 4**) em substratos diferentes, foram realizadas com o objetivo de quantificar o peróxido produzido nessas concentrações e também, de observar a utilização do meio de cultura LIT completo como substrato para produção de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> extracelular, ou seja, no próprio meio de tratamento. De acordo com Ande et al., (2008), as espécies reativas de oxigênio são formadas extracelularmente, e podem se dirigir para membranas celulares, promovendo alteração da permeabilidade.

Os resultados demonstraram que as duas SV-LAAOs botrópicas apresentaram maior atividade utilizando L-leucina como substrato, em comparação com o meio LIT completo - aminoácidos são encontrados no soro fetal bovino (GSTRAUNTHALER, 2003; VAN DER VALK et al., 2010). Confirmando a preferência das LAAOs por substratos hidrofóbicos, provavelmente devida aos três subsítios hidrofóbicos presentes no sítio de ligação do substrato das LAAOs (COSTA et al., 2018). Contudo, mesmo a produção de peróxido sendo menor na presença do meio LIT, a quantidade produzida foi suficiente para os efeitos citotóxicos em todas as células testadas.

Coincidentemente, a concentração em comum (1,563 µg/mL) para as duas SV-LAAOs testadas, produziu aproximadamente a mesma quantidade de peróxido utilizando os dois substratos (L-leucina e meio LIT completo)

na atividade de LAAO; porém, apresentou citotoxicidades completamente discrepantes nos tratamentos dos parasitos nas duas espécies de *Leishmania*, demonstrando que as SV-LAAOs botrópicas têm sua atividade alterada frente aos parasitos *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*.

Este teste possibilitou a obtenção de dados extremamente interessantes porque permitiu inferir que a citotoxicidade das SV-LAAOs estudadas está relacionada com o estresse oxidativo, uma vez que na presença de catalase não houve efeito citotóxico sobre os parasitos; mas concomitantemente, também existe uma distinção na ação biológica dessas enzimas, que pode estar relacionada com o próprio H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> e/ou com outros fatores, especulando uma certa especificidade da BjussuLAAO-II e BmoolLAAO.

Dessa forma, surgem questionamentos como: “É possível que as SV-LAAOs utilizem compostos presentes nos parasitos como substratos para aumentar a produção de peróxido, ou o produto enzimático derivado da catálise do meio LIT é suficiente para toda a citotoxicidade observada? Quais mecanismos e fatores contribuem para a diferença entre as ações biológicas das SV-LAAOs em células? Será que existe algum tipo de interação ou resposta induzida por essas enzimas? Diferenças estruturais são responsáveis pelos distintos efeitos antiparasitários?”. Claramente, mais estudos são necessários para elucidação de novas informações sobre essa classe de enzimas.

A espécie reativa de oxigênio, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, gerada pela catálise enzimática promovida por LAAOs, é altamente tóxica podendo apresentar ações sobre ácidos nucleicos e membranas plasmáticas, além de alto efeito desnaturante em proteínas (FINDRIK et al., 2006; IZIDORO et al., 2014). Costal-Oliveira et al. (2019) marcou com fluorescência uma SV-LAAO da peçonha de *Bothrops atrox* demonstrando uma internalização dessa enzima por queratinócitos, sugerindo a catálise enzimática de substratos intracelulares que contribuem para a citotoxicidade da SV-LAAO. Ande et al., (2006) descreveu que células Jurkat cultivadas sofreram apoptose induzida pela SV-LAAO, mas que o H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> produzido não foi o único responsável por esse mecanismo, pois também houve atividade na presença de catalase. Outro trabalho com SV-LAAO mostrou uma

interação entre a enzima nativa e deglicosilada com células de levedura (ANDE et al., 2008).

As curvas de crescimento realizadas com formas promastigota das duas espécies de *Leishmania*, indicaram que todas as concentrações testadas das duas SV-LAAOs botrópicas causaram grande efeito antiproliferativo em todos os parasitos, principalmente em relação ao controle. Até o presente trabalho, a literatura não apresentava dados de SV-LAAOs com ação antiproliferativa, contudo existem estudos dessas enzimas com outras células. Li Lee et al. (2014) demonstraram efeitos antiproliferativos de uma L-aminoácido oxidase em células de câncer MCF-7 e A549; assim como Zainal Abidin et al. (2018) reportaram o mesmo efeito em células SW480 e SW620 tratadas com CR-LAAO; e CV-LAAOI da peçonha de *Cerastes vipera* também inibiu a proliferação de várias linhagens tumorais testadas (SALAMA et al., 2018).

É conhecido na literatura que parasitos do gênero *Leishmania* possuem somente uma mitocôndria, sendo locais chave para suprimento energético, assim como responsáveis pelo balanço entre viabilidade e morte do parasito. O aumento da permeabilidade mitocondrial é indicador do processo de morte celular, portanto disfunções na mitocôndria podem prejudicar e interferir na sobrevivência dos parasitos (COOMBS et al., 1986; COSTA et al., 2019; LOEFFLER; KROEMER, 2000; TASBIHI et al., 2019).

Os resultados obtidos demonstraram que todas concentrações testadas para BjussuLAAO-II e BmooLAAO, alteraram o  $\Delta\Psi_m$  nos parasitos *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*, diminuindo a intensidade média de fluorescência nos tratados. Interessantemente e junto com os dados obtidos na atividade específica de LAAO, 0,781  $\mu\text{g/mL}$  (citotoxicidade menor que 10%) foi capaz de produzir uma quantidade de peróxido que não diminuiu a viabilidade dos parasitos, mas ao mesmo tempo foi suficiente para causar um estresse mitocondrial detectável.

No processo de apoptose alterações no  $\Delta\Psi_m$  é uma das características podem ser exibidas, (KATHURIA et al., 2014; RIBEIRO et al., 2016), e informações na literatura já demonstraram que esse processo também pode ocorrer em protozoários cinetoplastídeos, não sendo limitada

a organismos multicelulares. Contudo, no gênero *Leishmania*, vias que levam a apoptose ainda não são bem esclarecidas, principalmente por conta da falta de conhecimento sobre proteínas e fatores envolvidos, devido às diferenças que os parasitos possuem em relação aos mamíferos, como receptores de morte, presença de moléculas pró e anti-apoptóticas (BASMACIYAN et al., 2018).

O peróxido de hidrogênio produzido pelas SV-LAAOs tem um papel importante na indução da apoptose celular, entretanto, já foi demonstrado em células tumorais que esse processo induzido por SV-LAAOs é diferente da apoptose ocasionada por H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> exógeno (RIBEIRO et al., 2016). Shaha (2006) relatou que estudos com formas promastigota de *L. donovani* sofreram morte semelhante à apoptose, após tratamento com peróxido de hidrogênio. Até o presente trabalho, ainda não se encontrou na literatura os efeitos das SV-LAAOs no  $\Delta\Psi_m$  de parasitos das espécies *L. (L.) amazonensis* ou *L. (V.) braziliensis*, todavia estudos em células tumorais também demonstram a despolarização de mitocôndrias induzidas por SV-LAAOs em células MCF-7 (MUKHERJEE et al., 2015) e LNCaP(TAN et al., 2017).

Para a detecção de espécies reativas de oxigênio, foi utilizado a sonda CM-H<sub>2</sub>DCFDA não fluorescente permeável às células, que quando oxidada no citosol, é desesterificada intracelularmente transformando em um composto altamente fluorescente (2',7'- diclorofluoresceína). Por isso, é possível identificar a presença de espécies reativas de oxigênio em resposta ao metabolismo oxidativo (SIGMA).

Com os resultados obtidos da análise de EROs foi possível perceber que cada enzima estudada aumentou significativamente a produção de espécies reativas de oxigênio em somente uma das espécies testadas. Logo, este resultado corrobora a ideia especulativa de especificidade das enzimas BjussuLAAO-II e BmooLAAO em relação as espécies de *Leishmania*. É descrito na literatura que SV-LAAOs podem apresentar variações quanto à especificidade do substrato, atividades enzimáticas e biológicas (CARONE et al., 2017). Estudos também demonstraram que as ações biológicas das SV-LAAOs são parcialmente dependentes do

peróxido de hidrogênio, sugerindo que há a possibilidade de receptores ou alvos específicos nas células (LI et al., 2008; ZHANG et al., 2004).

Mukherjee et al. (2015) mostraram que a SV-LAAO rusvinoxidase, da peçonha de *Daboia russelii russelii*, induziu apoptose em células MCF-7 também pela via de sinalização extrínseca, através de receptores; além de um aumento na produção de espécies reativas de oxigênio. Ande et al., (2008) demonstrou que a LAAO de *Calloselasma rhodostoma* induziu a produção de EROs em células de levedura; assim como Cmp-LAAO da peçonha de *Crotalus mitchelliipyrhusi* na linhagem celular LNCaP(TAN et al., 2017), e BaltLAAO-I de *Bothrops alternatus* em células JURKAT (RIBEIRO et al., 2016).

Em muitos estudos na literatura, o aumento de EROs está relacionado com a alteração do  $\Delta\Psi_m$ , contudo, curiosamente as maiores mudanças na fluorescência nas análises da atividade de EROs (BjussuLAAO-II em *L. (L.) amazonensis* e BmooLAAO em *L. (V.) braziliensis*) não foram as mesmas que apresentaram maior alteração do  $\Delta\Psi_m$  dos parasitos. Nas condições em que a produção de espécies reativas de oxigênio é aumentada, a mitocôndria dos parasitos pode sofrer danos, influenciando a viabilidade celular, contudo, dependendo do impacto, as células podem conseguir reparar irregularidades por meio de um sistema de defesa e reparo contra os danos produzidos por EROs (OTT et al., 2007).

## 6. CONCLUSÃO

Até a presente data, ensaios antiproliferativos, de alteração do potencial mitocondrial ( $\Delta\Psi_m$ ) e produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular, em espécies de *Leishmania* induzidos por SV-LAAOs, ainda não haviam sido reportados.

Os efeitos derivados do estresse oxidativo produzidos pelo produto das LAAOs (peróxido de hidrogênio) causados nas duas espécies de *Leishmania*, permitiu a aquisição de novos dados demonstrando a possível existência de diferentes mecanismos envolvendo o  $H_2O_2$ , e uma diferente susceptibilidade das espécies de *Leishmania* às SV-LAAOs. A análise das

estruturas primárias juntamente com o sequenciamento *de novo*, permitiu quantificar as modificações pós-traducionais de cada enzima; e, essa distinção estrutural observada pode contribuir para os diferentes efeitos biológicos observados. Curiosamente, a BjussuLAAO-II – com mais modificações pós-traducionais – apresentou maior citotoxicidade.

Apesar dos novos resultados obtidos, muitas perguntas surgiram, abrindo espaço para outras pesquisas e análises mais específicas, tanto estruturais quanto biológicas; demonstrando que além do potencial biotecnológico dessas enzimas, a continuação com estudos sobre estas moléculas são de extrema importância para elucidação de mecanismos e fatores ainda desconhecidos.

## 7. REFERÊNCIAS

ALI, S. A. et al. Pharmacological effects of the leaf-nosed viper snake (*Eristocophis macmahoni*) venom and its HPLC fractions. **Toxicon**, p. 13, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00243-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00243-8)

AMORIM, F. et al. Proteopectidomic, Functional and Immunoreactivity Characterization of Bothrops moojeni Snake Venom: Influence of Snake Gender on Venom Composition. **Toxins**, v. 10, n. 5, p. 177, abr. 2018. <https://doi.org/10.3390/toxins10050177>

AMORIM, F. G. et al. New findings from the first transcriptome of the Bothrops moojeni snake venom gland. **Toxicon**, v. 140, p. 105-117, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.025>

AMORIM, F. G. et al. Proteome of fraction from Tityus serrulatus venom reveals new enzymes and toxins. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 25, n. 0, abr. 2019. <https://doi.org/10.1590/1678-9199-jvatitd-1482-18>

ANDE, S. R. et al. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the Malayan pit viper Calloselasma rhodostoma. **Yeast**, v. 25, n. 5, p.

349-357, maio 2008. <https://doi.org/10.1002/yea.1592>

BAÑULS, A.-L.; HIDE, M.; PRUGNOLLE, F. Leishmania and the Leishmaniases: A Parasite Genetic Update and Advances in Taxonomy, Epidemiology and Pathogenicity in Humans. In: **Advances in Parasitology**. [s.l.] Elsevier, 2007. v. 64 p. 1-458. [https://doi.org/10.1016/S0065-308X\(06\)64001-3](https://doi.org/10.1016/S0065-308X(06)64001-3)

BARBOSA, A. M. et al. Effect of Low-Level Laser Therapy in the Myonecrosis Induced by Bothrops jararacussu Snake Venom. **Photomedicine and Laser Surgery**, v. 27, n. 4, p. 591-597, ago. 2009. <https://doi.org/10.1089/pho.2008.2296>

BASMACIYAN, L. et al. Temporal analysis of the autophagic and apoptotic phenotypes in Leishmania parasites. **Microbial Cell**, v. 5, n. 9, p. 404-417, set. 2018. <https://doi.org/10.15698/mic2018.09.646>

BELLO, C. A. et al. Isolation and biochemical characterization of a fibrinolytic proteinase from Bothrops leucurus (white-tailed jararaca) snake venom. **Biochimie**, v. 88, n. 2, p. 189-200, fev. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2005.07.008>

BENKERT, P.; BIASINI, M.; SCHWEDE, T. Toward the estimation of the absolute quality of individual protein structure models. **Bioinformatics**, v. 27, n. 3, p. 343-350, 2011. <https://doi.org/10.1093/bioinformatics/btq662>

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. [21] Snake venom metalloendopeptidases: Reprolysins. In: **Methods in Enzymology**. [s.l.] Elsevier, 1995. v. 248, p. 345-368. [https://doi.org/10.1016/0076-6879\(95\)48023-4](https://doi.org/10.1016/0076-6879(95)48023-4)

BORDON, K. C. F. et al. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from Crotalus durissus terrificus snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 21, n. 1, p. 26, dez. 2015. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0025-8>

BRAHMA, R. K. et al. Venom gland transcriptomics for identifying,



cataloging, and characterizing venom proteins in snakes. **Toxicon**, v. 93, p. 1-10, jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.10.022>

BRAUD, S. Snake venom proteins acting on hemostasis. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 851-859, set. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01178-0](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01178-0)

CALDWELL, M. W. et al. The oldest known snakes from the Middle Jurassic-Lower Cretaceous provide insights on snake evolution. **Nature Communications**, v. 6, n. 1, p. 5996, maio 2015. <https://doi.org/10.1038/ncomms6996>

CALVETE, J. J. et al. Venoms, venomics, antivenomics. **FEBS Letters**, v. 583, n. 11, p. 1736-1743, jun. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.febslet.2009.03.029>

CALVETE, J. J. Proteomic tools against the neglected pathology of snake bite envenoming. **Expert Review of Proteomics**, v. 8, n. 6, p. 739-758, dez. 2011. <https://doi.org/10.1586/epr.11.61>

CAMACHO, C. et al. BLAST+: architecture and applications. **BMC Bioinformatics**, v. 10, n. 1, p. 421, 2009. <https://doi.org/10.1186/1471-2105-10-421>

CARDOSO, J. L. C. et al. Venomous animals in Brazil: biology, clinic and therapeutics of envenomations. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 45, n. 6, p. 338-338, dez. 2003. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000600009>

CARONE, S. E. I. et al. A new L -amino acid oxidase from Bothrops jararacussu snake venom: Isolation, partial characterization, and assessment of pro-apoptotic and antiprotozoal activities. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 103, p. 25-35, out. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2017.05.025>

CARRASCO, P. A. et al. Morphology, phylogeny and taxonomy of South American bothropoid pitvipers (Serpentes, Viperidae): South American

bothropoids systematics. **Zoologica Scripta**, v. 41, n. 2, p. 109-124, mar. 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1463-6409.2011.00511.x>

CARRASCO, P. A. et al. Nomenclatural instability in the venomous snakes of the Bothrops complex: Implications in toxinology and public health. **Toxicon**, v. 119, p. 122-128, set. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.05.014>

CENTER FOR DISEASE CONTROL AND PREVENTION – CDC. Parasites – Leishmaniasis - Biology. Disponível em: <<https://www.cdc.gov/parasites/leishmaniasis/biology.html>>. Acesso em: 12 jun. 2019.

CHAN, Y. S. et al. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Applied Microbiology and Biotechnology**, v. 100, n. 14, p. 6165-6181, jul. 2016. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7610-9>

CHIPPAUX, J.-P. Snakebite envenomation turns again into a neglected tropical disease! **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 23, n. 1, p. 38, dez. 2017. <https://doi.org/10.1186/s40409-017-0127-6>

COOMBS, G. H. et al. Three dimensional structure of the leishmania amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections. **Parasitology**, v. 92, n. 1, p. 13-23, fev. 1986. <https://doi.org/10.1017/S0031182000063411>

CORPET, F. Multiple sequence alignment with hierarchical clustering. **Nucleic Acids Research**, v. 16, n. 22, p. 10881-10890, nov. 1988. <https://doi.org/10.1093/nar/16.22.10881>

CORREA-NETTO, C. et al. Immunome and venome of Bothrops jararacussu: A proteomic approach to study the molecular immunology of snake toxins. **Toxicon**, v. 55, n. 7, p. 1222-1235, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.12.018>

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S. Répteis do Brasil e suas Unidades

Federativas: Lista de espécies. v. 8, p. 50, 2018.

COSTA, M. S. et al. Increased ROS generation causes apoptosis-like death: Mechanistic insights into the anti-Leishmania activity of a potent ruthenium(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 1-12, jun. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.005>

COSTA, T. R. et al. Snake venom L-amino acid oxidases: an overview on their antitumor effects. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 20, n. 1, p. 23, 2014. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-23>

COSTA, T. R. et al. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from Calloselasma rhodostoma venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 489-497, set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.004>

COSTA, T. R. et al. Kinetic investigations and stability studies of two Bothrops L-amino acid oxidases. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24, n. 1, p. 37, dez. 2018. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0172-9>

COSTA TORRES, A. F. et al. 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, abr. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.11.013>

COSTAL-OLIVEIRA, F. et al. L-amino acid oxidase from Bothrops atrox snake venom triggers autophagy, apoptosis and necrosis in normal human keratinocytes. **Scientific Reports**, v. 9, n. 1, p. 781, dez. 2019. <https://doi.org/10.1038/s41598-018-37435-4>

CUNHA, E. M., & MARTINS, O. A. Principais compostos químicos presentes nos venenos de cobras dos gêneros Bothrops e Crotalus. **Revista Eletrônica de Educação e Ciência (REEC)**, v. 2, n. 2. 2012.

DE ALVARENGA, E. S. et al. Synthesis and evaluation of sesquiterpene

lactone inhibitors of phospholipase A2 from *Bothrops jararacussu*. **Toxicon**, v. 57, n. 1, p. 100-108, jan. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2010.10.010>

DE MELO ALVES PAIVA, R. et al. Cell cycle arrest evidence, parasiticidal and bactericidal properties induced by l-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93, n. 5, p. 941-947, maio 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.01.009>

DU, X.-Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom l-amino acid oxidases [Toxicon 40(6) (2002) 659-665]. **Toxicon**, v. 40, n. 9, p. 1381, set. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00157-5](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00157-5)

DUAN, G.; WALTHER, D. The Roles of Post-translational Modifications in the Context of Protein Interaction Networks. **PLOS Computational Biology**, v. 11, n. 2, p. e1004049, fev. 2015. <https://doi.org/10.1371/journal.pcbi.1004049>

FINDRIK, Z. et al. Modelling of l-DOPA enzymatic oxidation catalyzed by l-amino acid oxidases from *Crotalus adamanteus* and *Rhodococcus opacus*. **Biochemical Engineering Journal**, v. 27, n. 3, p. 275-286, jan. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bej.2005.08.022>

FOX, J. W. A brief review of the scientific history of several lesser-known snake venom proteins: l-amino acid oxidases, hyaluronidases and phosphodiesterases. **Toxicon**, v. 62, p. 75-82, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.009>

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Structural considerations of the snake venom metalloproteinases, key members of the M12 reprotolysin family of metalloproteinases. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 969-985, jun. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.012>

FOX, J. W.; SERRANO, S. M. T. Insights into and speculations about snake venom metalloproteinase (SVMP) synthesis, folding and disulfide bond formation and their contribution to venom complexity: Snake venom metalloproteinases and venom complexity. **FEBS Journal**, v. 275, n. 12, p.

3016-3030, jun. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2008.06466.x>

FRANÇA, S. C. et al. Molecular approaches for structural characterization of Bothrops amino acid oxidases with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 355, n. 2, p. 302-306, abr. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.217>

GOMES, M. S. R.; BRANDEBURGO, M. I. H. UMA NOVA METALOPROTEINASE DO VENENO DE *Bothrops moojeni* (Caiçaca). p. 72, 2006.

GOMIS-RÜTH, F. X. Structural Aspects of the Metzincin Clan of Metalloendopeptidases. **Molecular Biotechnology**, v. 24, n. 2, p. 157-202, 2003. <https://doi.org/10.1385/MB:24:2:157>

GONTIJO, B. Leishmaniose tegumentar americana. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, p. 10, 2003. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822003000100011>

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaniose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 7, n. 3, p. 338-349, set. 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>

GREMSKI, L. H. et al. A novel expression profile of the *Loxosceles intermedia* spider venomous gland revealed by transcriptome analysis. **Molecular BioSystems**, v. 6, n. 12, p. 2403, 2010. <https://doi.org/10.1039/c004118a>

GSTRAUNTHALER, G. Alternatives to the use of fetal bovine serum: serum-free cell culture. **ALTEX**, v. 20, n. 4, p. 275-281, 2003.

GUEX, N.; PEITSCH, M. C.; SCHWEDE, T. Automated comparative protein structure modeling with SWISS-MODEL and Swiss-PdbViewer: A historical perspective. **ELECTROPHORESIS**, v. 30, n. S1, p. S162-S173, jun. 2009.

<https://doi.org/10.1002/elps.200900140>

GUIMARÃES, C. L. S. et al. Alkylation of Histidine Residues of Bothrops jararacussu Venom Proteins and Isolated Phospholipases A 2: A Biotechnological Tool to Improve the Production of Antibodies. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 1-12, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/981923>

GUO, C. et al. Past decade study of snake venom l-amino acid oxidase. **Toxicon**, v. 60, n. 3, p. 302-311, set. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.05.001>

GUTIÉRREZ, J. Snake venom metalloproteinases: Their role in the pathogenesis of local tissue damage. **Biochimie**, v. 82, n. 9-10, p. 841-850, set. 2000. [https://doi.org/10.1016/S0300-9084\(00\)01163-9](https://doi.org/10.1016/S0300-9084(00)01163-9)

GUTIÉRREZ, J. M. et al. Snakebite envenoming. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 3, n. 1, p. 17063, dez. 2017. <https://doi.org/10.1038/nrdp.2017.63>

HARRISON, R. A. et al. Identification of cDNAs encoding viper venom hyaluronidases: Cross-generic sequence conservation of full-length and unusually short variant transcripts. **Gene**, v. 392, n. 1-2, p. 22-33, maio 2007. <https://doi.org/10.1016/j.gene.2006.10.026>

HELENO, M. A. G. et al. Cytotoxic Activity Of A New Isoform L-Amino Acid Oxidase (Balt-Laao-li) From Bothrops Alternatus (Urutu) Snake Venom In Human Leukemic HI60 Cells. p. 21. 2017

IZIDORO, L. F. M. et al. Biochemical and functional characterization of an l-amino acid oxidase isolated from Bothrops pirajai snake venom. **Bioorganic & Medicinal Chemistry**, v. 14, n. 20, p. 7034-7043, out. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.025>

IZIDORO, L. F. M. et al. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Trends in Pharmacology and Biochemistry. **BioMed Research International**, v.

2014, p. 1-19, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/196754>

JACKSON, K. The evolution of venom-delivery systems in snakes. **Zoological Journal of the Linnean Society**, v. 137, n. 3, p. 337-354, mar. 2003. <https://doi.org/10.1046/j.1096-3642.2003.00052.x>

JACKSON, K. The evolution of venom-conducting fangs: Insights from developmental biology. **Toxicon**, v. 49, n. 7, p. 975-981, jun. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2007.01.007>

JUNQUEIRA-DE-AZEVEDO, I. et al. Colubrid Venom Composition: An -Omics Perspective. **Toxins**, v. 8, n. 8, p. 230, 23 jul. 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins8080230>

KANG, T. S. et al. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis: Enzymatic toxins from snake venom. **FEBS Journal**, v. 278, n. 23, p. 4544-4576, dez. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>

KASHIMA, S. et al. Analysis of Bothrops jararacussu venomous gland transcriptome focusing on structural and functional aspects1: I-gene expression profile of highly expressed phospholipases A2. **Biochimie**, v. 86, n. 3, p. 211-219, mar. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2004.02.002>

KATHURIA, M. et al. Induction of Mitochondrial Dysfunction and Oxidative Stress in Leishmania donovani by Orally Active Clerodane Diterpene. **Antimicrobial Agents and Chemotherapy**, v. 58, n. 10, p. 5916-5928, out. 2014. <https://doi.org/10.1128/AAC.02459-14>

KEMPARAJU, K.; GIRISH, K. S. Snake venom hyaluronidase: a therapeutic target. **Cell Biochemistry and Function**, v. 24, n. 1, p. 7-12, jan. 2006. <https://doi.org/10.1002/cbf.1261>

KETELHUT, D. F. J. et al. Isolation, characterization and biological activity of acidic phospholipase A2 isoforms from Bothrops jararacussu snake venom. **Biochimie**, v. 85, n. 10, p. 983-991, out. 2003.

<https://doi.org/10.1016/j.biochi.2003.09.011>

KIMA, P. E. The amastigote forms of Leishmania are experts at exploiting host cell processes to establish infection and persist. **International Journal for Parasitology**, v. 37, n. 10, p. 1087-1096, ago. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.04.007>

KOCHVA, E. The origin of snakes and evolution of the venom apparatus. **Toxicon**, v. 25, n. 1, p. 65-106, jan. 1987. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(87\)90150-4](https://doi.org/10.1016/0041-0101(87)90150-4)

LAINSON, R. The Neotropical Leishmania species: a brief historical review of their discovery, ecology and taxonomy. **Revista Pan-Amazônica de Saúde**, v. 1, n. 2, jun. 2010. <https://doi.org/10.5123/S2176-62232010000200002>

LAZO, F. et al. Biochemical, biological and molecular characterization of an L-Amino acid oxidase (LAAO) purified from Bothrops pictus Peruvian snake venom. **Toxicon**, v. 139, p. 74-86, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.10.001>

LEE, M. S. Y.; SCANLON, J. D. Snake phylogeny based on osteology, soft anatomy and ecology. **Biological Reviews of the Cambridge Philosophical Society**, v. 77, n. 3, p. 333-401, ago. 2002. <https://doi.org/10.1017/S1464793102005924>

LI LEE, M. et al. Antiproliferative Activity of King Cobra ( Ophiophagus hannah ) Venom L -Amino Acid Oxidase. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 114, n. 4, p. 336-343, abr. 2014. <https://doi.org/10.1111/bcpt.12155>

LI, R. et al. L-amino acid oxidase from Naja atra venom activates and binds to human platelets. **Acta Biochimica et Biophysica Sinica**, v. 40, n. 1, p. 19-26, jan. 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1745-7270.2008.00372.x>

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita. **Experimental Cell Research**, v. 256, n. 1, p.



19-26, abr. 2000. <https://doi.org/10.1006/excr.2000.4833>

LU, W. et al. Isolation and pharmacological characterization of a new cytotoxic L-amino acid oxidase from Bungarus multicinctus snake venom. **Journal of Ethnopharmacology**, v. 213, p. 311-320, mar. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jep.2017.11.026>

MAMEDE, C. C. N. et al. Comparative analysis of local effects caused by Bothrops alternatus and Bothrops moojeni snake venoms: enzymatic contributions and inflammatory modulations. **Toxicon**, v. 117, p. 37-45, jul. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.03.006>

MANJUNATHA KINI, R. Excitement ahead: structure, function and mechanism of snake venom phospholipase A2 enzymes. **Toxicon**, v. 42, n. 8, p. 827-840, dez. 2003. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2003.11.002>

MARKLAND, F. S.; SWENSON, S. Snake venom metalloproteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 3-18, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.004>

MATSUI, T.; FUJIMURA, Y.; TITANI, K. Snake venom proteases affecting hemostasis and thrombosis. **Biochimica et Biophysica Acta**, p. 11. 2000.

MILANI JUNIOR, R. Snake bites by the jararacucu (Bothrops jararacussu): clinicopathological studies of 29 proven cases in Sao Paulo State, Brazil. **QJM**, v. 90, n. 5, p. 323-334, maio 1997. <https://doi.org/10.1093/qjmed/90.5.323>

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por animais peçonhentos: o que fazer e como evitar. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Acidentes por animais peçonhentos - Serpentes. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>>. Acesso em: 7 jun. 2019

MINISTÉRIO DA SAÚDE. Brasil copatrocinou resolução para o problema dos acidentes ofídicos no mundo. Disponível em: <<http://www.saude.gov.br/noticias/svs/43413-brasil-copatrocinou-resolucao-para-o-problema-dos-acidentes-ofidicos-no-mundo>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunological Methods**, v. 65, n. 1-2, p. 55-63, dez. 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MOURA-DA-SILVA, A. et al. Processing of Snake Venom Metalloproteinases: Generation of Toxin Diversity and Enzyme Inactivation. **Toxins**, v. 8, n. 6, p. 183, jun. 2016. <https://doi.org/10.3390/toxins8060183>

MOURA-DA-SILVA, A.; BUTERA, D.; TANJONI, I. Importance of Snake Venom Metalloproteinases in Cell Biology: Effects on Platelets, Inflammatory and Endothelial Cells. **Current Pharmaceutical Design**, v. 13, n. 28, p. 2893-2905, out. 2007. <https://doi.org/10.2174/138161207782023711>

MOUSTAFA, I. M. et al. Crystal Structure of LAAO from Calloselasma rhodostoma with an L-Phenylalanine Substrate: Insights into Structure and Mechanism. **Journal of Molecular Biology**, v. 364, n. 5, p. 991-1002, dez. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.032>

MUKHERJEE, A. K. et al. Apoptosis induction in human breast cancer (MCF-7) cells by a novel venom L-amino acid oxidase (Rusvinoxidase) is independent of its enzymatic activity and is accompanied by caspase-7 activation and reactive oxygen species production. **Apoptosis**, v. 20, n. 10, p. 1358-1372, out. 2015. <https://doi.org/10.1007/s10495-015-1157-6>

NAIK, B. S. "Dry bite" in venomous snakes: A review. **Toxicon**, v. 133, p. 63-67, jul. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.04.015>

NEVES, D. P., MELO, A. L., LINARDI, P. M., VITOR, R. W. A. Parasitologia Humana. 11 ed. São Paulo: Aheneu, 2004.

NICOLETI, A. F. et al. Comparison of Bothropoides jararaca bites with and without envenoming treated at the Vital Brazil Hospital of the Butantan Institute, State of São Paulo, Brazil. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 657-661, dez. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000600011>

NIEVES, E.; PIMENTA, P. F. P. Development of Leishmania (Viannia) braziliensis and Leishmania (Leishmania) amazonensis in the sand fly Lutzomyia migonei (Diptera: Psychodidae). **Journal of Medical Entomology**, v. 37, n. 1, p. 134-140, 1 jan. 2000. <https://doi.org/10.1603/0022-2585-37.1.134>

NOGUEIRA, M. F.; SOTTO, M. N.; CUCÉ, L. C. American tegumentary leishmaniasis: langerhans cells in montenegro skin test. **Revista do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo**, v. 50, n. 5, p. 283-286, out. 2008. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652008000500007>

OLIVEIRA, F. N et al. Accidents caused by Bothrops and Bothropoides in the State of Paraíba: epidemiological and clinical aspects. **Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical**, v. 43, n. 6, p. 662-667, nov-dez. 2010. <https://doi.org/10.1590/S0037-86822010000600012>

OTT, M. et al. Mitochondria, oxidative stress and cell death. **Apoptosis**, v. 12, n. 5, p. 913-922, maio 2007. <https://doi.org/10.1007/s10495-007-0756-2>

PONNUDURAI, G., CHUNG, M. C. M., TAN, N. H. Purification and properties of the L-Amino Acid Oxidase from Malayan Pit Viper (Calloselasma rhodostoma) Venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, v. 313, n. 2, p. 373-378. 1994. <https://doi.org/10.1006/abbi.1994.1401>

PORTELLA, M. F. Programa de Pós-Graduação em Medicina Tropical - Mestrado. p. 74. Dissertação de Mestrado. Instituto Oswaldo Cruz. 2018.

QUEIROZ, G. P. et al. Interspecific variation in venom composition and toxicity of Brazilian snakes from Bothrops genus. **Toxicon**, v. 52, n. 8, p. 842-851, dez. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.10.002>

QUEIROZ, S. J. D. IDENTIFICAÇÃO DA ATIVIDADE ANTIMICROBIANA NO VENENO DA SERPENTE Bothrops moojeni EM BACTÉRIAS GRAM NEGATIVAS. p. 93. Dissertação de Mestrado. Pontifícia Universidade Católica de Goiás. Goiânia 2010.

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, mar. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.005>

REY-SUÁREZ, P. et al. MipLAAO, a new L-amino acid oxidase from the redtail coral snake Micrurus mipartitus. **PeerJ**, v. 6, p. e4924, jun. 2018. <https://doi.org/10.7717/peerj.4924>

RIBEIRO, P. H. et al. Mechanism of the cytotoxic effect of L-amino acid oxidase isolated from Bothrops alternatus snake venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 92, p. 329-337, nov. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2016.07.022>

RODRIGUES, R. S. et al. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from Bothrops pauloensis snake venom. **Biochimie**, v. 91, n. 4, p. 490-501, abr. 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.004>

RODRIGUES, V. et al. Bothrops pauloensis Snake Venom Toxins: The Search for New Therapeutic Models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**, v. 15, n. 7, p. 670-684, 10 mar. 2015. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150217120347>

SAJEVIC, T.; LEONARDI, A.; KRIŽAJ, I. Haemostatically active proteins in snake venoms. **Toxicon**, v. 57, n. 5, p. 627-645, abr. 2011.

<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2011.01.006>

SALAMA, W. H. et al. L -Amino acid oxidase from Cerastes vipera snake venom: Isolation, characterization and biological effects on bacteria and tumor cell lines. **Toxicon**, v. 150, p. 270-279, ago. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.064>

SANT'ANA MALAQUE, C. M.; GUTIÉRREZ, J. M. Snakebite Envenomation in Central and South America. In: BRENT, J. et al. (Eds.). **Critical Care Toxicology**. Cham: Springer International Publishing, 2015. p. 1-22. [https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2\\_146-1](https://doi.org/10.1007/978-3-319-20790-2_146-1)

SANTANA, V. T. P.; SUCHARA, E. A. Epidemiologia dos acidentes com animais peçonhentos registrados em Nova Xavantina - MT. **Revista de Epidemiologia e Controle de Infecção**, v. 5, n. 3, p. 141-146, 4 jul. 2015. <https://doi.org/10.17058/reci.v5i3.5724>

SARTIM, M. A. et al. Moojenactivase, a novel pro-coagulant PIIId metalloprotease isolated from Bothrops moojeni snake venom, activates coagulation factors II and X and induces tissue factor up-regulation in leukocytes. **Archives of Toxicology**, v. 90, n. 5, p. 1261-1278, maio 2016. <https://doi.org/10.1007/s00204-015-1533-6>

SCHALOSKE, R. H.; DENNIS, E. A. The phospholipase A2 superfamily and its group numbering system. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular and Cell Biology of Lipids*, v. 1761, n. 11, p. 1246-1259, nov. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bbalip.2006.07.011>

SCHLEIN, Y. Leishmania and Sandflies: Interactions in the life cycle and transmission. **Parasitology Today**, v. 9, n. 7, p. 255-258, jul. 1993. [https://doi.org/10.1016/0169-4758\(93\)90070-V](https://doi.org/10.1016/0169-4758(93)90070-V)

SERRANO, S. M. T. The long road of research on snake venom serine proteinases. **Toxicon**, v. 62, p. 19-26, fev. 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.09.003>

SERRANO, S. M. T.; MAROUN, R. C. Snake venom serine proteinases:

sequence homology vs. substrate specificity, a paradox to be solved. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 1115-1132, jun. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.020>

SHAHA, C. Apoptosis in Leishmania species & its relevance to disease pathogenesis. **INDIAN J MED RES**, p. 12, 2006.

SIGMA. 2',7'-Dichlorofluorescein diacetate D6883. Disponível em: <<https://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/d6883>>. Acesso em: 15 jun. 2019.

SILVEIRA, F. T.; LAINSON, R.; CORBETT, C. E. Clinical and immunopathological spectrum of American cutaneous leishmaniasis with special reference to the disease in Amazonian Brazil: a review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, v. 99, n. 3, p. 239-251, maio 2004. <https://doi.org/10.1590/S0074-02762004000300001>

STÁBELI, R. G. et al. Cytotoxic L-amino acid oxidase from Bothrops moojeni: Biochemical and functional characterization. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 41, n. 2, p. 132-140, jul. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006>

SUHR, S.-M.; KIM, D.-S. Identification of the Snake Venom Substance That Induces Apoptosis. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 224, n. 1, p. 134-139, jul. 1996. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1996.0996>

SUNTER, J.; GULL, K. Shape, form, function and Leishmania pathogenicity: from textbook descriptions to biological understanding. **Open Biology**, v. 7, n. 9, p. 170165, set. 2017. <https://doi.org/10.1098/rsob.170165>

TAN, K. K. et al. In vitro cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of *Crotalus mitchellii pyrrhus*. **Toxicon**, v. 139, p. 20-30, dez. 2017. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2017.09.012>

TASBIHI, M. et al. Mitochondrial proteome profiling of *Leishmania tropica*.

**Microbial Pathogenesis**, v. 133, p. 103542, ago. 2019.  
<https://doi.org/10.1016/j.micpath.2019.103542>

TASOULIS, T.; ISBISTER, G. A Review and Database of Snake Venom Proteomes. **Toxins**, v. 9, n. 9, p. 290, set. 2017.  
<https://doi.org/10.3390/toxins9090290>

TEIXEIRA, T. L. et al. Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from *Crotalus durissus terrificus* venom on human cancer cell lines. **Toxicon**, v. 119, p. 203-217, set. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.009>

TEMPONE, A. G. et al. Bothrops moojeni Venom Kills Leishmania spp. with Hydrogen Peroxide Generated by Its -Amino Acid Oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 280, n. 3, p. 620-624, jan. 2001. <https://doi.org/10.1006/bbrc.2000.4175>

THE REPTILE DATABASE. Advanced search. Disponível em: <[http://reptile-database.reptarium.cz/advanced\\_search](http://reptile-database.reptarium.cz/advanced_search)>. Acesso em: 7 jun. 2019.

THE REPTILE DATABASE. Species Statistics Aug 2016. Disponível em: <<http://www.reptile-database.org/db-info/SpeciesStat.html>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

TORRES, A. et al. Antimicrobial activity of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops leucurus* snake venom. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 16, n. 4, p. 614-622, 2010. <https://doi.org/10.1590/S1678-91992010000400012>

ULLAH, A. et al. Structural insights into selectivity and cofactor binding in snake venom L-amino acid oxidases. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 421, n. 1, p. 124-128, abr. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2012.03.129>

VALLE, A. L., & BRITES, V. L. C. Nomes populares e aspectos ecológicos de *Bothrops pauloensis* (Amaral,1925) em áreas antropizadas do Triângulo

e Alto Paranaíba, Minas Gerais. **Revista Brasileira de Zootecias**, v. 10, n. 2, p. 155-161, ago. 2008.

VAN DER VALK, J. et al. Optimization of chemically defined cell culture media - Replacing fetal bovine serum in mammalian in vitro methods. **Toxicology in Vitro**, v. 24, n. 4, p. 1053-1063, jun. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.tiv.2010.03.016>

VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. Herpetology: an introductory biology of amphibians and reptiles. Fourth edition ed. Amsterdam; Boston: Elsevier, AP, Academic Press is an imprint of Elsevier, 2014.

VONK, F. J. et al. Evolutionary origin and development of snake fangs. **Nature**, v. 454, n. 7204, p. 630-633, jul. 2008. <https://doi.org/10.1038/nature07178>

VU, T. T. et al. Batroxobin Binds Fibrin with Higher Affinity and Promotes Clot Expansion to a Greater Extent than Thrombin. *Journal of Biological Chemistry*, v. 288, n. 23, p. 16862-16871, 7 jun. 2013. <https://doi.org/10.1074/jbc.M113.464750>

VYAS, V. K. et al. Therapeutic potential of snake venom in cancer therapy: current perspectives. **Asian Pacific Journal of Tropical Biomedicine**, v. 3, n. 2, p. 156-162, fev. 2013. [https://doi.org/10.1016/S2221-1691\(13\)60042-8](https://doi.org/10.1016/S2221-1691(13)60042-8)

WARD, R. J. et al. Refolding and Purification of Bothropstoxin-I, a Lys49-Phospholipase A2 Homologue, Expressed as Inclusion Bodies in *Escherichia coli*. **Protein Expression and Purification**, v. 21, n. 1, p. 134-140, fev. 2001. <https://doi.org/10.1006/prep.2000.1353>

WHITE, J. Snake venoms and coagulopathy. **Toxicon**, v. 45, n. 8, p. 951-967, jun. 2005. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.02.030>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Epidemiological situation. Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/burden/en/>>. Acesso em: 11 jun.



2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Snakebite. Disponível em: <<https://www.who.int/health-topics/snakebite#tab=overview>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Snakebite envenoming. Disponível em: <<https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/snakebite-envenoming>>. Acesso em: 7 jun. 2019.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. What is leishmaniasis? Disponível em: <<http://www.who.int/leishmaniasis/disease/en/>>. Acesso em: 11 jun. 2019.

ZAINAL ABIDIN, S. A. et al. Cytotoxic, Antiproliferative and Apoptosis-inducing Activity of L-Amino Acid Oxidase from Malaysian *Calloselasma rhodostoma* on Human Colon Cancer Cells. **Basic & Clinical Pharmacology & Toxicology**, v. 123, n. 5, p. 577-588, nov. 2018. <https://doi.org/10.1111/bcpt.13060>

ZELANIS, A. et al. Snake venom serine proteinases specificity mapping by proteomic identification of cleavage sites. **Journal of Proteomics**, v. 113, p. 260-267, jan. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2014.10.002>

ZHANG, H. et al. Hydrogen Peroxide produced by Two Amino Acid Oxidases Mediates Antibacterial Actions. v. 42, n. 4, p. 5. 2004.

ZHANG, J. et al. PEAKS DB: De Novo Sequencing Assisted Database Search for Sensitive and Accurate Peptide Identification. v. 11, n. 4 . p. 8, abr. 2012. <https://doi.org/10.1074/mcp.M111.010587>

ZUG, G. R.; VITT, L. J.; CALDWELL, J. P. Herpetology: An Introductory Biology of Amphibians and Reptiles. [s.l.] Elsevier, 2001.

ZULIANI, J. et al. Snake Venom L-Amino Acid Oxidases: Some Consideration About their Functional Characterization. **Protein & Peptide Letters**, v. 16, n. 8, p. 908-912, ago. 2009.

<https://doi.org/10.2174/092986609788923347>

ZULIANI, J. P.; GUTIÉRREZ, J. M.; TEIXEIRA, C. Signaling pathways involved in zymosan phagocytosis induced by two secreted phospholipases A2 isolated from Bothrops asper snake venom in macrophages. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 113, p. 575-582, jul. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2018.02.158>

## APÊNDICE

Figuras completas do sequenciamento *de novo* das SV-LAOs BjussuLAAO-II (**Figura A**) e BmoLAAO (**Figura B**), demonstrando todas as modificações pós-traducionais encontradas nas enzimas do presente trabalho.

