

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

**EFEITO ANTILEISHMANIA DO INIBIDOR DE FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> ( $\gamma$ CdcPLI)  
ISOLADO DO SORO DE *Crotalus durrisus collilineatus* SOBRE FORMAS  
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

**Aluna: Marina Neves Gonçalves**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**

**Uberlândia- MG**

**2021**

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

**EFEITO ANTILEISHMANIA DO INIBIDOR DE FOSFOLIPASE A<sub>2</sub> ( $\gamma$ CdcPLI)  
ISOLADO DO SORO DE *Crotalus durrisus collilineatus* SOBRE FORMAS  
PROMASTIGOTAS DE *Leishmania (Leishmania) amazonensis***

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

**Aluna: Marina Neves Gonçalves**

**Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila**

**Uberlândia-MG**

**2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

G635e  
2021      Gonçalves, Marina Neves, 1994-  
            Efeito antileishmania do inibidor de fosfolipase A2 ( $\gamma$ CdcPLI) isolado do soro de *Crotalus durrisus collilineatus* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* [recurso eletrônico] / Marina Neves Gonçalves. - 2021.

            Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.  
            Dissertação (Mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia.  
            Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica.  
            Modo de acesso: Internet.  
            Disponível em: <http://doi.org/10.14393/ufu.di.2022.5030>  
            Inclui bibliografia.  
            Inclui ilustrações.

            1. Bioquímica. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues, (Orient.). II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica. III. Título.

---

CDU: 577.1

André Carlos Francisco  
Bibliotecário - CRB-6/3408



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**  
 Coordenação do Programa de Pós-Graduação em Genética e Bioquímica  
 Av. Pará 1720, Bloco 2E, Sala 244 - Bairro Umarama, Uberlândia-MG, CEP 38400-902  
 Telefone: +55 (34) 3225-8438 - www.ppggb.ibtec.ufu.br - ppggb@ufu.br



### ATA DE DEFESA - PÓS-GRADUAÇÃO

Programa de Pós-Graduação em:	Genética e Bioquímica				
Defesa de:	Dissertação de Mestrado Acadêmico/PPGGB.				
Data:	Trinta e um de janeiro de dois mil e vinte e dois	Hora de início:	08:40h	Hora de encerramento:	09:10h
Matrícula do Discente:	11922GBI005				
Nome do Discente:	Marina Neves Gonçalves				
Título do Trabalho:	Efeito de um inibidor de fosfolipase A <sub>2</sub> isolado do soro de <i>Crotalus durrisus collilienceatus</i> sobre formas promastigotas de <i>Leishmania (leishmania) amazonensis</i> .				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura, função, caracterização de biomoléculas e compostos bioativos e suas aplicações.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Ação antiangiogênica e antimetastática de uma fosfolipase A <sub>2</sub> de peçonha ofídica em câncer de mama: uma abordagem <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> .				

Aos trinta e um dias do mês de janeiro de dois mil e vinte e dois, às 08:40 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma *Cisco Webex*, em conformidade com a Portaria nº 36, de 19 de março de 2020 da Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES e Resolução de nº 06/2020 do Conselho de Pesquisa e Pós-graduação pela Universidade Federal de Uberlândia, a Banca Examinadora, designada pelo Colegiado do Programa de Pós-graduação em Genética e Bioquímica, assim composta: Professores Doutores: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila (Orientadora), Mônica Soares Costa Veiga e Renata Santos Rodrigues. A participação dos dois últimos se deu por epístola. Iniciando os trabalhos o (a) presidente Dr (a). Veridiana de Melo Rodrigues Ávila apresentou a Comissão Examinadora e o candidato(a), agradeceu a presença dos participantes, e concedeu ao Discente a palavra para a exposição do seu trabalho. A duração da apresentação do Discente e o tempo de arguição e resposta foram conforme as normas do Programa. A seguir o senhor(a) presidente procedeu a leitura das epístolas enviadas pelos membros da banca. Em seguida os membros presentes, passaram a arguir o(a) candidato(a). Ultimada a leitura das epístolas e a arguição, que se desenvolveu dentro dos termos regimentais, a Banca, em sessão secreta, atribuiu o resultado final, considerando o(a) candidato(a):

( A ) PROVADO.

Esta defesa de Dissertação de Mestrado é parte dos requisitos necessários à obtenção do título de Mestre. O competente diploma será expedido após cumprimento dos demais requisitos, conforme as normas do Programa, a legislação pertinente e a regulamentação interna da UFU. Nada mais havendo a

tratar foram encerrados os trabalhos. Foi lavrada a presente ata que após lida e achada conforme foi assinada pela Banca Examinadora.



Documento assinado eletronicamente por **Veridiana de Melo Rodrigues Avila, Professor(a) do Magistério Superior**, em 31/01/2022, às 09:27, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Renata Santos Rodrigues, Membro de Comissão**, em 31/01/2022, às 09:29, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Mônica Soares Costa Veiga, Usuário Externo**, em 01/02/2022, às 08:02, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site [https://www.sei.ufu.br/sei/controlador\\_externo.php?acao=documento\\_conferir&id\\_orgao\\_acesso\\_externo=0](https://www.sei.ufu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0), informando o código verificador **3282519** e o código CRC **EBDC7716**.

Referência: Processo nº 23117.089503/2021-47

SEI nº 3282519

Criado por [janaina.mota](#), versão 7 por [janaina.mota](#) em 26/01/2022 09:35:07.

## **Dedicatória**

Dedico esse trabalho à minha família que foram essenciais para me manter otimista e perseverante.

Dedico também esse trabalho à minha Orientadora, que não mediu esforços para me ajudar, me deu conselhos valiosos e acreditou na minha capacidade.

Dedico também aos futuros cientistas, que mesmo diante das dificuldades nunca desistiram de se dedicarem à ciência.

## **Agradecimentos**

Agradeço primeiramente à minha família que nunca deixaram de acreditar em mim, mesmo nos momentos que eu mesma desistia. Quero agradecer meus pais que foram meus melhores amigos e meus maiores incentivadores para seguir sempre em frente e não ter medo de enfrentar a vida.

Ao meu namorado Matheus que me ensinou a enxergar a vida com outros olhos, me ensinou acreditar nas minhas capacidades e me ensinou a amar incondicionalmente.

Ao Vitor, que foi durante todo o processo de crescimento na vida acadêmica e pessoal, meu melhor amigo, meu professor, meu conselheiro. Agradeço o seu apoio incondicional, sem você eu não seria metade do que eu sou hoje.

À minha orientadora, pela paciência em aguentar meus ataques de ansiedade (risos), esempre me dar oportunidades de crescimento tanto profissional e pessoal. Nunca esquecerei quando falou que a palavra que me descrevia era coragem e até hoje eu tenho essa palavra como um guia para nunca desistir.

Aos meus colegas de laboratório, vocês alegravam meu dia, me auxiliavam nos meus perrengues, muitas risadas, muitos choros e me davam ânimo para acreditar na ciência.

À minha querida amiga Marina, você é uma mulher espetacular! Sempre te admirei pela sua força de vontade, por tudo que você passou e ainda sim ter garra para lutar! Você é minha inspiração de vida!

Aos demais amigos de vida, obrigado pelos momentos de descontração, alegria, a paciência de me escutarem reclamar e chorar. Espero muitos anos pela frente de amizade.

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

C. d.: *Crotalus durissus*

HPLC: Cromatografia líquida de alta eficiência

IDH: Índice de Desenvolvimento Humano

LC: Leishmaniose cutânea

LCD: Leishmaniose cutânea difusa

LCA: Leishmaniose cutânea americana

LCM: Leishmaniose cutaneomucosa

LV: Leishmaniose visceral

MTT: 3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium

OMS: Organização Mundial de Saúde

OPAS: Organização Pan-Americana de Saúde

PBS: Tampão fosfato salino

PLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub>

PLI: Inibidor de fosfolipase

cPLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub> citosólicas

iPLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub> independente de cálcio

PAF-AH: fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase

LPLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub> lisossomais

AdPLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub> específicas do tecido adiposo

sPLA<sub>2</sub>: Fosfolipase A<sub>2</sub> secretadas

SDS: Dodecil sulfato de sódio

SDS-PAGE: Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS



## LISTA DE FIGURAS

### Capítulo 1

Figura 1: Dados disponibilizados pelos Ministérios da Saúde - Programas Nacionais de Leishmanioses dos países. ....	13
Figura 2: Ciclo de vida da <i>Leishmania ssp.</i> .....	15
Figura 3: Sítios de hidrólise das fosfolipases. ....	18

### Capítulo 2

Figure 1: Isolation of $\gamma$ CdcPLI from <i>C. d. Collilineatus</i> snake serum. ....	65
Figure 2: Effects of $\gamma$ CdcPLI inhibitor on the viability of Macrophages C57 and <i>L.(L) amazonensis</i> promastigotes.. ....	66
Figure 3: Effects of $\gamma$ CdcPLI on <i>L. (L.) amazonensis</i> cell cycle.. ....	67
Figure 4: Effect of $\gamma$ CdcPLI on the invasive capacity of <i>L.(L.) amazonensis</i> promastigotes in macrophagesC57.. ....	68

## Sumário

LISTA DE ABREVIATURAS.....	6
LISTA DE FIGURAS .....	7
Apresentação .....	10
Capítulo 1: .....	11
Fundamentação teórica.....	11
1.1 Aspectos gerais sobre a Leishmaniose.....	12
1.2 Fosfolipases: Classificação, distribuição e aspectos funcionais .....	17
1.3 Papel das fosfolipases no contexto biológico da leishmaniose.....	21
1.4 Inibidores de PLA <sub>2</sub> na Leishmaniose .....	23
1.5 Referências.....	26
CAPITULO 2 .....	39
Artigo científico.....	39
Abstract.....	41
1. Introduction .....	42
2. Material and methods .....	45
2.1 <i>C. d. collilineatus</i> serum and venom.....	45
2.2 Isolation of PLA <sub>2</sub> inhibitor from <i>C. d. collilineatus</i> serum ( $\gamma$ CdcPLI).....	45
2.3 Inhibition of PLA <sub>2</sub> activity .....	46
2.4 Cell culture and parasite maintenance .....	47
2.5 Cellular viability in promastigote forms of <i>L. (L.) amazonensis</i> .....	47
2.6 Cellular viability in macrophages C57 .....	48
2.7 Cell cycle analysis .....	48
2.8 Invasion assay .....	49
2.9 Statistical analysis.....	49
3. Results and Discussion.....	51
3.1 Isolation of PLA <sub>2</sub> inhibitor from <i>C. d. collilineatus</i> serum ( $\gamma$ CdcPLI).....	51
3.2 $\gamma$ CdcPLI decreases the viability of promastigotes forms of <i>L. (L.) Amazonensis</i> and macrophages C57.....	52
3.3 $\gamma$ CdcPLI promoted cell cycle arrest in G1phase and reduction in G2/M phase in promastigote forms of <i>L.(L.) amazonensis</i> .....	53
3.4 $\gamma$ CdcPLI interferes directly in the infective capacity of promastigote forms and modulates the host cell environment .....	54

4. Conclusion .....	56
References.....	58
Figures: .....	65

## Apresentação

As leishmanioses são um conjunto de doenças causadas por protozoários do gênero *Leishmania* e da família Trypanosomatidae. São parasitas intracelulares obrigatórios que invadem as células fagocíticas do hospedeiro. A OMS (Organização Mundial de Saúde) caracteriza essa doença como uma das seis doenças infecciosas mais importantes do mundo.

Alguns estudos têm demonstrado o papel de fosfolipases na interação parasito-hospedeiro como um processo essencial para o início da proliferação e virulência. As fosfolipases são enzimas amplamente distribuídas nos organismos vivos, estão envolvidas no catabolismo de lipídeos provenientes da dieta, bem como no metabolismo de lipídeos estruturais de membranas celulares, entre outros mecanismos, tais como processos de sinalização celular que resultam em vários efeitos incluindo ativação da resposta imune, proliferação celular e morte celular. Estudos que utilizam inibidores de fosfolipases tentam entender melhor as funções dessas enzimas nos mais diversos processos biológicos de diferentes organismos. Além disso, estes estudos buscam formas alternativas para o tratamento de doenças onde as fosfolipases estão envolvidas, como na leishmaniose.

Nesse contexto, o presente trabalho descreve o efeito antileishmania de um inibidor de fosfolipase A<sub>2</sub> denominado  $\gamma$ CdcPLI purificado do soro do sangue da serpente *Crotalus durissus colillineatus* sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. A dissertação foi redigida em dois capítulos seguindo as normas de elaboração de Teses da Pós-graduação em Genética e Bioquímica da Universidade Federal de Uberlândia. O capítulo 1 traz uma fundamentação teórica, ou seja, um levantamento bibliográfico sobre o assunto estudado. O capítulo 2 foi escrito em formato de manuscrito no qual traz uma contextualização teórica, a metodologia empregada, bem como os resultados, discussão e conclusão obtida do presente estudo. O manuscrito será submetido à revista *Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases*, cujo fator de impacto está dentro do exigido pelas normas da Pós-graduação em Genética e Bioquímica da UFU.

## **Capítulo 1:**

### **Fundamentação teórica**

## 1.1 Aspectos gerais sobre a Leishmaniose

A leishmaniose é um conjunto de síndromes complexas e multifacetadas, com diferentes manifestações clínicas, causadas pelos protozoários das espécies do gênero *Leishmania spp.* Há três formas clínicas, que são mucocutânea (LCM), visceral (LV) e cutânea (LC). A cutânea se subdivide em leishmaniose cutânea americana (LCA), leishmaniose localizada (LCL) e leishmaniose difusa (LCD), esta última possui metástases cutâneas (LEELAYOOVA S. et al., 2017).

De acordo com Anversa e colaboradores (2018), este parasita é endêmico em pelo menos 98 países e mais de 90% dos casos mundiais de LV ocorrem em seis países (Índia, Bangladesh, Sudão, Sudão do Sul, Etiópia e Brasil). Já em relação à LC, a sua distribuição é em torno de um terço dos casos que ocorrem nas Américas, na bacia do Mediterrâneo e na Ásia ocidental, principalmente no Afeganistão, Argélia, Colômbia, Brasil, Irã, Síria, Etiópia, Norte Sudão, Costa Rica e Peru (MANNAN et al 2021). Em geral a leishmaniose apresenta uma maior ocorrência em regiões com baixo IDH (Índice de Desenvolvimento Humano) e com alto índice pluviométrico, tanto que os casos da doença aumentam no período chuvoso e/ou de enchentes. Fatores ambientais também influenciam, pois o desmatamento é um dos fatores responsáveis para que vetores percam suas fontes alimentares habituais e migrem para a zona urbana (SILVA et al., 2021)

Conforme dados obtidos pela OPAS (Organização Pan-Americana de Saúde) entre os anos de 2001 a 2019, foram registrados 1.028.054 casos de leishmaniose cutânea (LC) e mucosa (LM) em 17 dos 18 países endêmicos das Américas (com exceção da Guiana Francesa), com uma média de 54.108 casos por ano. No território brasileiro, em 2019 houve mais de 15 mil pessoas infectadas (figura 1), acometendo principalmente o sexo masculino acima de 20 anos, correspondendo a porcentagem de 61%. A leishmaniose cutânea (LC) é uma das doenças tropicais mais comuns e mais negligenciadas do mundo e muitas vezes não é priorizada pelos formuladores de políticas públicas, embora as consequências possam ser graves e permanentes (OPAS, 2020).

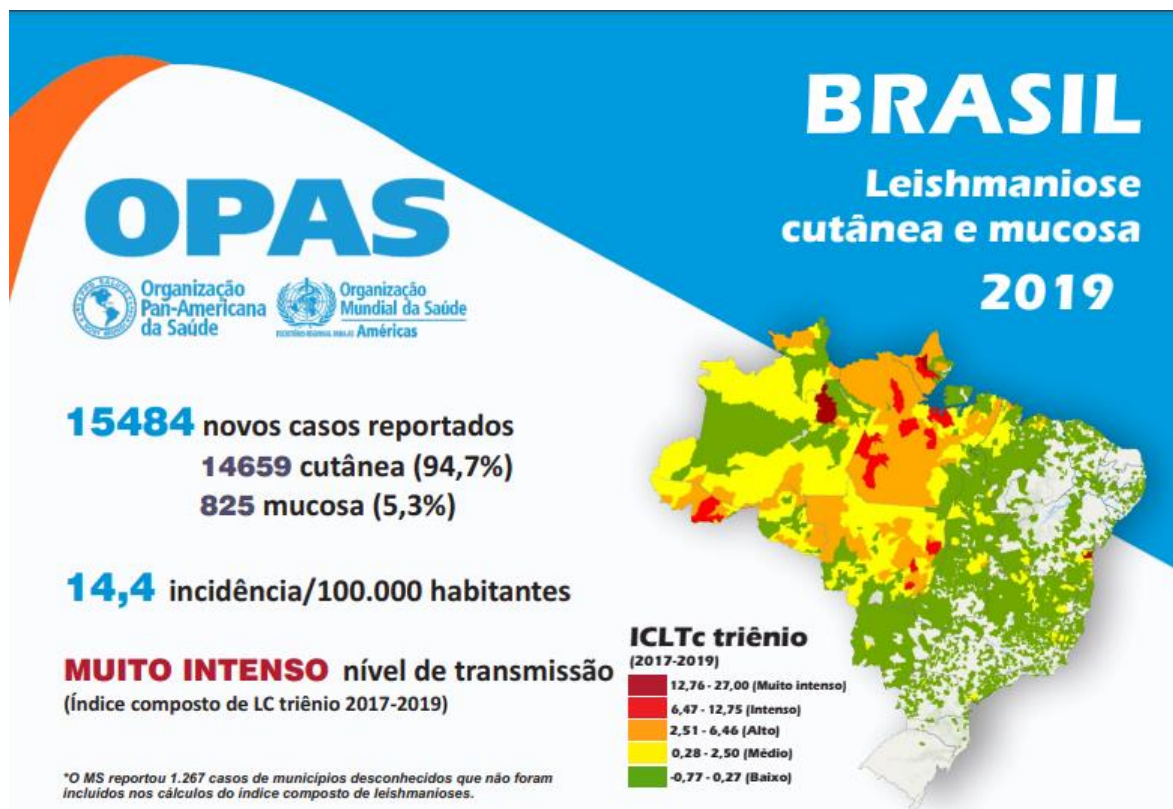


Figura 1: Dados disponibilizados pelo Ministério da Saúde - Programas Nacionais de Leishmanioses dos países. Acesso em: 14 de outubro de 2021. Fonte: Recortada de SisLeish - OPAS/OMS -

Existem mais de 30 espécies de *Leishmania* descritas no mundo, dentre as quais aproximadamente 20 causam doença no homem (BARI, 2006; BAÑULS et al., 2007). As diferentes espécies de *Leishmania* estão agrupadas principalmente em dois subgêneros, *L. (Leishmania)* e *L. (Viannia)*. De maneira geral, as espécies classificadas no subgênero *L. (Viannia)* apresentam desenvolvimento pobre em meio de cultura, desenvolvimento lento em hamsters experimentalmente infectados e desenvolvem-se no intestino posterior do flebotomíneo, ficando os parasitos aderidos à parede, na região do piloro. Já as espécies do subgênero *L. (Leishmania)* geralmente crescem facilmente em cultura, provocam grandes lesões nodulares em hamsters, com metástase para as extremidades, e se desenvolvem no intestino médio e anterior de flebotomíneos (CUPOLILLO et al., 2014).

Os subgêneros (*Viannia* e *Leishmania*) foram separados com base na localização dos parasitos no intestino do vetor (BAÑULS et al., 2007) e, por sua vez, foram subdivididos em “complexos”: *Leishmania donovani*, *Leishmania mexicana* e *Leishmania*

*braziliensis*. No Brasil, devido à importância parasitológica como causa da leishmaniose tegumentar em humanos, destaca-se as seguintes espécies: *Leishmania (Viannia) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, do subgênero *Vianniae* complexo *braziliensis*; e, *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, do subgênero *Leishmania* e complexo *mexicana* (NEVES, 2005).

Os parasitas do gênero *Leishmania* são digenéticos (heteroxenos) e apresentam diferentes formas adaptativas amastigotas e promastigota. (Figura 2). As formas promastigotas e paramastigotas são flageladas e ficam aderidas pelo flagelo ao trato digestivo do hospedeiro invertebrado, enquanto as formas intracelulares, denominadas amastigotas, são encontradas no vacúolo digestivo das células do sistema mononuclear fagocitário do hospedeiro vertebrado (BAKER et al 2021).

Os ciclos de transmissão da leishmaniose variam de acordo com a região geográfica, envolvendo uma grande diversidade de espécies de *Leishmania*, vetores (hospedeiros invertebrados) e hospedeiros vertebrados (reservatórios). Os vetores são as fêmeas dos insetos chamados flebotomíneos, pertencentes à ordem Diptera, família Psychodidae, subfamília Phlebotominae e gênero *Phlebotomus*, no Velho Mundo, e *Lutzomyia*, no Novo Mundo (Brasil Ministério da Saúde 2007).

O complexo ciclo de vida das espécies de *Leishmania* (Figura 2) inicia após serem ingeridas durante a picada no reservatório vertebrado, a amastigota se diferencia em promastigota procíclica, que é uma forma altamente reprodutiva e pouco infectiva. Depois migra para faringe do vetor e se transforma em promastigota metacíclica que é uma forma altamente infectiva e pouco reprodutiva. As promastigotas também podem ser tornar paramastigotas na região anterior do estômago, indo depois colonizar o esôfago e a faringe, onde se diferenciam em promastigotas metacíclicas. (INBAR et al., 2019).

O desenvolvimento do parasito no hospedeiro vertebrado acontece de forma eficiente. Os flebotomíneos fêmea, que são vetores hematófagos obrigatórios, ao realizar o repasto sanguíneo inocula no hospedeiro as formas promastigotas metacíclicas na derme do hospedeiro vertebrado que, por sua vez, são fagocitadas por células do sistema monocítico fagocitário, tais como macrófagos. Uma vez dentro dos macrófagos, as promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas. O ciclo reinicia-se quando a fêmea ingere formas amastigotas livres no sangue ou no tecido, além de macrófagos infectados. Logo após, dentro do vetor há a maturação e desenvolvimento do parasito que auxilia na sua diferenciação (DE CASTRO et al., 2012).



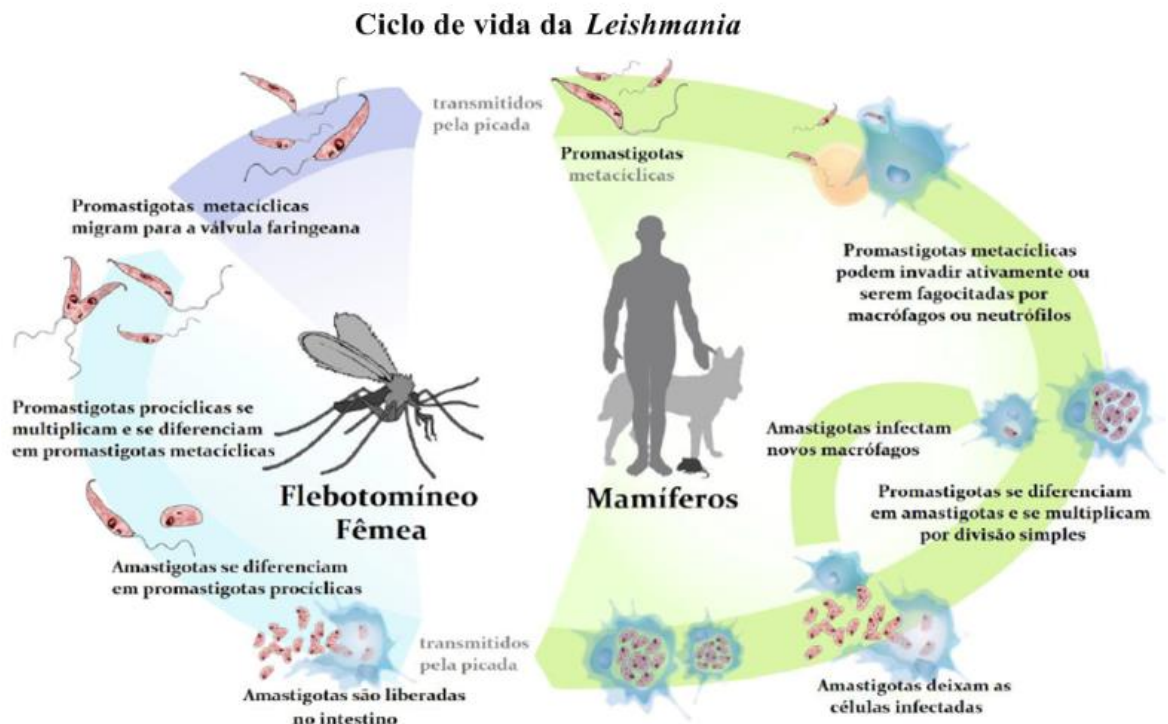


Figura 2: Ciclo de vida da *Leishmania ssp.*

(Acesso em [https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis\\_life\\_cycle\\_diagram\\_en.svg?uselang=pt-br](https://commons.wikimedia.org/wiki/File:Leishmaniasis_life_cycle_diagram_en.svg?uselang=pt-br)).

Após o processo de internalização do parasito no macrófago hospedeiro, dá-se início ao progresso das manifestações clínicas da doença. A gravidade da doença vai depender da espécie de *Leishmania* envolvida com a infecção e do estado genético e imunológico do hospedeiro, o qual pode apresentar-se assintomático ou evoluir para diversos processos patológicos que podem ser mais ou menos severos (ANTOINE et al., 2004).

A leishmaniose possui um largo espectro de sinais e sintomas clínicos, dada a grande diversidade e complexidade biológica do parasito, dos vetores e dos hospedeiros. Dessa forma, esta não é considerada uma doença simples, mas é considerada como um complexo de doenças que se apresenta sob diferentes manifestações clínicas (MITROPOULOS et al., 2010).

Na leishmaniose visceral, as manifestações clínicas geralmente se desenvolvem de forma gradual, semanas a meses após a inoculação do parasita, mas podem ser agudas ou assintomáticas. Os sintomas incluem febre irregular, hepatoesplenomegalia, pancitopenia e hipergamaglobulinemia policlonal com uma razão albumina: globulina

invertida. Em sua forma progressiva, o emagrecimento e morte ocorrem dentro de meses a anos (PAHO, 2020).

A leishmaniose mucocutânea se caracteriza por uma úlcera cutânea primária que se cicatriza espontaneamente, podendo ter lesões progressivas da mucosa que podem não ser aparentes durante meses ou anos. Sintomas típicos são de congestão nasal, secreção e dor, sendo que a infecção pode evoluir, resultando em mutilação de nariz, palato ou face (PAHO, 2020).

A leishmaniose cutânea pode ser caracterizada em dois tipos de manifestações clínicas: localizada e difusa. A localizada é causada por várias espécies de parasitos do gênero *Leishmania*. Na Região das Américas, foram descritas 15 espécies de *Leishmania* como agentes etiológicos da leishmaniose cutânea. Das espécies descritas, pertencem ao subgênero *Viannia*: *L. braziliensis*, *L. guyanensis*, *L. panamensis*, *L. shawi*, *L. naiffi*, *L. lainsoni*, *L. lindenbergi*, *L. peruviana* e *L. colombiensis*. Fazem parte do subgênero *Leishmania*: *L. mexicana*, *L. pifanoi*, *L. venezuelensis*, *L. garnhami*, *L. amazonensis* e *L. infantum* (ALENCAR et al 2020).

Durante o processo de infecção, é observado que os macrófagos teciduais são transportados por via linfática ou hematogênica dando origem a lesões cutâneas escalonadas, nodulares, papulosas ou ulceradas, linfadenite e adenopatias regionais (comuns entre as manifestações clínicas iniciais das leishmanioses cutâneas) (SANTOS et al 2021). Já na forma disseminada ou difusa, é considerada a forma grave e evoluída de leishmaniose cutânea, presente na América do Sul e em vários países do mundo. Caracteriza-se por uma diminuição das citocinas de tipo 1 no sangue periférico dos pacientes em comparação com os pacientes que apresentam leishmaniose cutânea localizada, em razão da atração das células T ativadas para as múltiplas lesões cutâneas (OLIVEIRA et al 2021).

O desenvolvimento da forma disseminada implica uma rede complexa da qual participam a resposta imune do hospedeiro e o meio ambiente. Na avaliação da resposta imune há uma menor produção de interferon gama (IFN- $\gamma$ ) e de fator de necrose tumoral (TFN), além de maiores concentrações de interleucina 10 (IL-10) e 17 (IL17) produzidas pelas células do sangue periférico em comparação com pacientes com leishmaniose cutânea localizada (ÁSSIMOS et al 2020).

A complexidade dos sintomas da Leishmaniose em grande parte é resultado da virulência do parasito que entre várias ações pode induzir respostas na célula hospedeira

como alterações no metabolismo lipídico que leva a remodelação da membrana plasmática pelo *turnover* de fosfolípidios de membrana. Tais efeitos podem facilitar no processo de adesão e invasão do parasito (PAWLOVIC e ZHANG, 2012). Estudos já relataram que a secreção de fosfolipases endógenas presentes em protozoários como *Trypanosoma gondii* e *Leishmania (L) amazonensis* aumenta a penetração dos parasitas nas células hospedeiras (SAFFER E KRUG, 1989; BELAUNZARÁN et al., 2010; BELAUNZARÁN et al., 2011; CASSAING et. al., 2012). Dada a estas ações, as fosfolipases constituem-se em um possível alvo para novos estudos que visam compreender melhor o processo de infecção do parasito nas células hospedeira e assim abrir caminhos alternativos para o desenvolvimento de terapias para a Leishmaniose.

## **1.2 Fosfolipases: Classificação, distribuição e aspectos funcionais**

As fosfolipases são enzimas amplamente distribuídas nos organismos vivos, estão envolvidas no catabolismo de lipídeos provenientes da dieta, bem como no metabolismo de lipídeos estruturais de membranas celulares, entre outros mecanismos, tais como processos de sinalização celular que resultam em vários efeitos incluindo ativação da resposta imune, proliferação celular e morte celular (GARCIA DENEGRÍ et al., 2010).

Estas enzimas são classificadas em cinco tipos de acordo com o sítio de clivagem em fosfolípidios: fosfolipase A<sub>1</sub>, fosfolipase A<sub>2</sub>, fosfolipase B, fosfolipase C e fosfolipase D (KINI, 1997) (Figura 3).

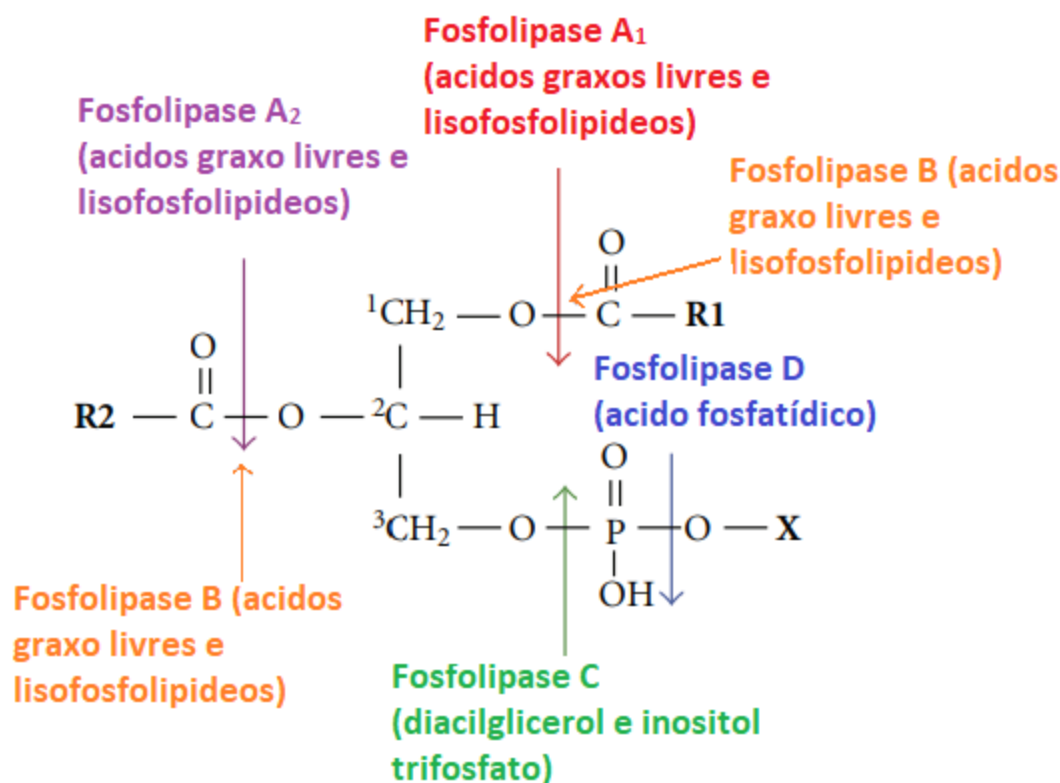


Figura 3: Sítios de hidrólise das fosfolipases. X: álcool polar como colina, serina, etanolamina, mio-inositol, glicerol e fosfatidilglicerol. R1 e R2: cadeias hidrocarbônicas de ácidos graxos. (Fonte: Traduzido e modificado de BELAUNZARÁN et al., 2011)

As fosfolipases A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>s, EC 3.1.1.4) são enzimas capazes de clivar fosfolípidos na posição *sn*-2, gerando ácidos graxos livres e lisofosfolípidos (ARNI; WARD, 1996; KINI, 2005). Fisiologicamente, as PLA<sub>2</sub>s são responsáveis pela liberação de ácido araquidônico, um ácido graxo que é precursor na produção de eicosanoides (prostaglandinas, tromboxanos e leucotrienos). Assim, as PLA<sub>2</sub>s estão relacionadas com diferentes efeitos biológicos, gerados por meio de ativação de vias de sinalização celular.

As PLA<sub>2</sub>s estão presentes em diversos organismos vivos, e de acordo com a origem, massa relativa e quantidade de ligações dissulfeto são agrupadas em seis grupos principais: As PLA<sub>2</sub> intracelulares citosólicas (cPLA<sub>2</sub>), independente de cálcio (iPLA<sub>2</sub>), fator ativador de plaquetas acetil-hidrolase (PAF-AH), lisossomais (LPLA<sub>2</sub>), específicas do tecido adiposo (AdPLA<sub>2</sub>) e as PLA<sub>2</sub> secretadas (sPLA<sub>2</sub>) (SCHALOSKE; DENNIS, 2006).

As cPLA<sub>2</sub> são amplamente distribuídas nas células da maioria dos tipos teciduais humano. São enzimas com massa molecular variando entre 61 a 114 kDa, possuem uma díade catalítica de Ser-Asp cujo mecanismo catalítico depende de íons Ca<sup>2+</sup> (DESSEN et

al., 1999). As cPLA<sub>2</sub> participam no metabolismo lipídico hidrolisando principalmente glicerofosfolipídeos como fosfatidilcolina e fosfatidiletanolamina (BURKE e DENNIS, 2009).

As PLA<sub>2</sub>s independentes de Ca<sup>2+</sup> (iPLA<sub>2</sub>s) são enzimas intracelulares que não requerem atividade de Ca<sup>2+</sup> e possuem uma massa molecular elevada entre 85 a 88 KDa. O sítio catalítico de iPLA<sub>2</sub>s é semelhante ao cPLA<sub>2</sub>s e elas não demonstram especificidade para o substrato, manifestando atividades de PLA<sub>2</sub>/PLA<sub>1</sub>, lisofosfolipase, transacilase e tioesterase (LIO e DENNIS, 1998; JENKINS et al., 2004; JENKINS et al., 2006; CARPER et al., 2008). As iPLA<sub>2</sub>s participam de vários processos biológicos, incluindo catabolismo de lipídeos, diferenciação celular, manutenção da integridade mitocondrial, remodelação de fosfolipídios, proliferação celular, transdução de sinal e morte celular (HERMANSSON et al., 2016).

As acetil-hidrolases de fatores ativadores de plaquetas (PAF-AH) podem ser encontradas com abundância em mamíferos, em locais como sistema nervoso central e em eritrócitos (BURKE e DENNIS, 2009). Desempenham importantes funções na coagulação sanguínea e nas vias inflamatórias (PRESCOTT et al., 2000). As PAF-AH possuem uma serina catalítica, realizam a hidrólise de grupos acetato da posição sn-2 de fatores ativadores de plaquetas (SCHALOSKE e DENIS, 2006), e não requerem Ca<sup>2+</sup> para catálise.

As PLA<sub>2</sub>s lisossomais (LPLA<sub>2</sub>) esterificam um grupo acil com um grupo hidroxil na posição C-1 de ceramidas, onde os fosfolipídeos atuam funcionalmente como doadores de radicais acil (ABE e SHAYAMAN, 1998). Esta enzima contém uma tríade Ser-His-Asp conservada e tem quatro resíduos de cisteína que são necessários para a atividade catalítica (HIRAOKA et al., 2005).

As PLA<sub>2</sub> tecido adiposo específicas (AdPLA<sub>2</sub>) são expressas no tecido adiposo e catalisam a liberação de ácidos graxos livres e lisofosfolipídeos a partir da fosfatidilcolina, realizando a hidrólise preferencialmente na posição sn-2 de fosfolipídeos (DUNCAN et al., 2008; JAWORSKI et al., 2009).

As PLA<sub>2</sub> secretadas estão entre as PLA<sub>2</sub>s mais bem estudadas. Estas contêm múltiplas isoformas que exibem distribuições celulares e teciduais únicas e seletividade de substrato (MURAKAMI et al., 2015), bem como funções fisiológicas distintas. Estão envolvidas na digestão, inflamação, geração de mediadores endógenos lipídicos, multiplicação celular, exocitose, ação microbicida, entre outras (MONTECUCCO et al.,

2008; LOMONTE e RANGEL, 2012; GUTIÉRREZ e LOMONTE, 2012). Estão agrupadas em 18 grupos principais (IA, IB, IIA, IIB, IIC, IID, IIE, IIF, III, V, IX, X, XIA, XIB, XIIA, XIIB, XIII e XIV) e vários subgrupos de acordo com critérios de homologia de sequência (SIX e DENNIS, 2000).

As sPLA<sub>2</sub> compreendem enzimas de baixa massa molecular (14 kDa), apresentam de 6 a 8 pontes de dissulfeto, com sítio catalítico contendo resíduos de aminoácidos conservados como uma histidina na posição 48 e um aspartato na posição 49, formando uma díade His/Asp catalítica (DENNIS et al., 2011). São enzimas sintetizadas por diferentes estímulos, e encontradas no interior de grânulos citoplasmáticos e então secretadas para o espaço extracelular. Altas concentrações de sPLA<sub>2</sub> do grupo IIA foram encontradas em lágrimas, plasma seminal, lúmen intestinal, exsudatos inflamatórios, lavado broncoalveolar e soro de pacientes com infecções bacterianas, indicando que a enzima está presente em locais estratégicos para contribuir para a defesa antibacteriana *in vivo* (LAMBEAU et al 2008)

As sPLA<sub>2</sub> também estão presentes nas peçonhas de animais como serpentes, escorpiões e aranhas. Há décadas vêm sendo exploradas quanto às suas propriedades estruturais e funcionais. Em muitos desses estudos, a caracterização estrutural traz aspectos importantes para a compreensão de seus mecanismos de ação das sPLA<sub>2</sub>.

De acordo com SCHALOSKE e DENNIS (2006), as PLA<sub>2</sub> de peçonhas de serpentes estão incluídas nos grupos IA e IIA sendo que o grupo I inclui a família Elapidae e grupo II as famílias Viperidae e Crotalidae (LOMONTE, 2012). PLA<sub>2</sub>s isoladas dessas peçonhas que pertencem ao grupo II são subdivididos em dois grupos principais: (i) enzimaticamente ativas (PLA<sub>2</sub>s Asp49), que exibem um resíduo Asp na posição 49, com elevada atividade catalítica sobre substratos artificiais; (ii) enzimaticamente inativas (variantes PLA<sub>2</sub>s Lys49), mostrando um resíduo Lisina na posição 49, estas possuem baixa ou nenhuma atividade catalítica, porém podem perturbar a integridade das membranas e induzir efeitos farmacológicos semelhantes aos descritos para as PLA<sub>2</sub>s Asp49 (DÍAZ et al., 1991; RUFINI et al., 1992; LOMONTE et al., 2003; LOMONTE e RANGEL, 2012). Algumas PLA<sub>2</sub>s da peçonha de serpentes apresentam outros substituintes de Asp49, como Ser49, Asn49, Arg49 e são classificadas como homólogas às PLA<sub>2</sub> Asp49. (POLGAR et al., 1996; KRIZAJ et al.,1991; PAN et al., 1998; TSAI et al., 2004;WEI et al., 2006).

A ausência de atividade catalítica nas PLA<sub>2</sub>-Lys49 era inicialmente atribuída à presença do resíduo de aminoácido Lisina localizado na posição 49 ocupada pelo Ca<sup>2+</sup> na PLA<sub>2</sub>S-Asp49 (ARNI e WARD, 1996; OWNBY et al., 1999; SOARES et al., 2004). Porém estudos de mutagênese com uma PLA<sub>2</sub>-Lys49 mostraram que o mutante Lys49Asp permaneceu cataliticamente inativo, demonstrando que não apenas a única substituição Asp49Lys, mas também outras modificações estruturais possíveis são responsáveis pela ausência da atividade enzimática (WARD et al., 2002). Há variações de aminoácidos que podem resultar em modificações no sítio ativo, como os aminoácidos que ocupam as posições 28, 31 e 32 que na Asp49 são Tyr, Leu e Gly, já no sítio das Lys49 essas posições são ocupadas pelos aminoácidos Asn, Val e Leu (ARNI e WARD, 1996, FERNANDES et al., 2010).

### 1.3 Papel das fosfolipases no contexto biológico da leishmaniose

As leishmanias possuem especializados sistemas de secreção que são usados para exportar fatores de virulência para a célula hospedeira, como mecanismos de defesa e como meio de interação entre parasito-célula hospedeira (SOUTO et al., 2013). O estudo de proteínas secretadas tem contribuído para um melhor entendimento dos mecanismos envolvidos na rota secretora de parasitos e outros tipos celulares (WEISE et al., 2000).

Os mecanismos da resposta imune nas leishmanioses envolvem componentes da imunidade inata e adaptativa, com ativação das respostas humoral e celular do hospedeiro (ROGERS et al., 2002). A primeira resposta à presença de um patógeno é caracterizada por uma reação inflamatória, com migração de células de defesa, alteração na permeabilidade vascular e a formação de mediadores solúveis, tais como as citocinas, quimiocinas e interferons (IFNs) (TRINCHIERI, 2007).

Após a infecção por parasitos do gênero *Leishmania* pode ocorrer uma resposta inata complexa incluindo ativação de células como os neutrófilos, monócitos, macrófagos, células dendríticas (DCs), “Natural Killer” (NK) e a ativação de receptores “toll-like” (HAMZA, 2010). Além disso, os macrófagos possuem receptores que reconhecem padrões moleculares dos parasitas, como o receptor para fucose, manose, o receptor para fibronectina, o receptor para a porção do fragmento Fc dos anticorpos e o receptor para proteína C reativa, que facilitam a entrada das formas promastigotas metacíclicas,

geralmente de maneira silenciosa, na célula hospedeira (NADERER e MCCONVILLE, 2008).

A protease da superfície da *Leishmania* com a maior abundância é a glicoproteína gp63 que é ancorada por ancora de GPI (GlicosilFosfatidil Inositol) e associada à “lipidrafts” no RE ou compartimentos muito iniciais da via exocítica. Em *Leishmania* foi demonstrada a presença de proteínas secretadas por microvesículas que auxiliam na comunicação com macrófagos e neutrófilos. (WEISE et al., 2000; DENNY, FIELD & SMITH, 2001; DENNY et al., 2004)

Alguns estudos utilizando diferentes patógenos como *Trypanosoma cruzi*, *Cryptosporidium parvum* e *Entamoeba histolytica* demonstraram a participação de fosfolipases no processo de remodelamento de membrana celular e de invasão celular (BERTELLO et al., 2000; BRONIA et al., 1999; PASSERO et al., 2008). Além disso, uma análise genômica em conjunto com atividade enzimática em *Leishmania*, indicaram a presença da enzima PLA<sub>2</sub> em promastigotas de *L. amazonensis* (PASSERO et al., 2008).

Passero e colaboradores (2008) demonstraram que macrófagos infectados com *L. (L.) amazonensis* tratados com PLA<sub>2</sub> apresentaram mais amastigotas intracelulares quando comparados ao grupo controle. Além disso, uma associação entre o parasitismo intracelular e a produção de PGE<sub>2</sub> por macrófagos infectados foi demonstrada. A produção de prostaglandinas pode modular não apenas a resposta imunológica, mas também o resultado do parasita à infecção, sugerindo que certos inibidores desta via complexa podem servir como ferramentas úteis para controlar o parasitismo - como os inibidores de PLA<sub>2</sub>, que é uma enzima chave responsável por desencadear a produção de prostaglandinas (GOULART et al, 2002).

A leishmaniose é comumente tratada com antimoniais pentavalentes - uma quimioterapia tóxica e cara com eficácia decrescente causada por aumentar a resistência microbiana em áreas endêmicas ou com drogas de substituição, como pentamidina, miltefosina e anfotericina B. A complexidade e variação das respostas imunes e imunopatologia em humanos e as diferentes interações com o hospedeiro das diferentes espécies de *Leishmania* têm um impacto sobre a eficácia das vacinas, diagnósticos e drogas. No entanto, devida à alta toxicidade sistêmica dos medicamentos injetáveis e orais, opções de tratamento tópico têm sido estudadas, indicado uma alternativa de tratamento promissora (MACHADO et al., 2004).



#### 1.4 Inibidores de PLA<sub>2</sub> na Leishmaniose

O importante papel das PLA<sub>2</sub> endógenas em diferentes sistemas biológicos demonstrado há várias décadas têm motivado as instituições acadêmicas e grandes companhias farmacêuticas a direcionarem seus estudos para o desenvolvimento de moléculas capazes de inibir especificamente a ação de PLA<sub>2</sub>. Alguns estudos têm demonstrado o potencial terapêutico de inibidores de PLA<sub>2</sub>, como ação antitumoral (GIMENES 2014;2018;2020), antimicrobiana (SILVEIRA, A.C.P. et al., 2020) e antiparasitária (DE SOUZA OLIVEIRA, M. et al., 2021).

PLA<sub>2</sub>s desempenham importantes funções para a virulência e sobrevivência de parasitos da *Leishmania* em hospedeiros vertebrados. A utilização de inibidores de PLA<sub>2</sub>, como metil araquidonilfluoronato, bromoenollactona e ácido aristolóquico sobre formas promastigota e amastigota de *L. (L.) amazonensis* levou à redução do tamanho de lesões e diminuiu a carga de parasitária na pele de camundongos BALB / c quando infectados com *L. (L.) amazonensis* (BORDON et al., 2018). BORGES e colaboradores (2018) demonstraram que os anticorpos IgY anti-PLA<sub>2</sub>-BnSP-7 foram citotóxicos para taquizoítos de *T. gondii* e promastigotas de *L. (L.) amazonensis*, bem como diminuíram a proliferação de ambos os parasitas tratados antes da infecção, inibindo também a invasão de formas promastigotas desse parasito. Além disso, os anticorpos IgY anti-PLA<sub>2</sub>-BnSP-7 reconheceram alvos nos extratos proteicos de *L. (L.) amazonensis* e *T. gondii* por ELISA e ensaios de imunofluorescência (BORGES et al., 2018).

A busca de novos fármacos em fontes alternativas de moléculas bioativas, consiste em uma abordagem bastante interessante; e com isso, surgem novas fontes de obtenção de inibidores de PLA<sub>2</sub>, como o soro de animais, principalmente mamíferos de hábitos onívoros e répteis, como serpentes peçonhentas e não peçonhentas (OVADIA; KOCHVA, 1977; DOMONT; PERALES; MOUSSATCHE, 1991; SOARES et al., 2000; FORTES-DIAS, 2002; LIZANO et al., 2003; MARCUSSI et al., 2007; GIMENES et al., 2014; SANTOS-FILHO AND SANTOS, 2017).

Acredita-se que a síntese destes inibidores séricos seja hepática, uma vez que o fígado é o principal produtor de proteínas plasmáticas, e sua produção é destinada à corrente sanguínea. Dessa forma, esta produção atua como proteção inata aos efeitos

tóxicos das peçonhas nestes animais que possuem hábitos ofiófagos, ou que são peçonhentos. Moléculas adquiridas a partir do plasma de serpentes nos últimos anos tem sido alvo de diversos estudos funcionais, estruturais e terapêuticos (DONNINI et al., 2011; LIZANO; DOMONT et al., 2003; GIMENES et al., 2014; GIMENES et al., 2017; NARUMI AOKI-SHIOI; CASSANDRA M. MODAHL, 2019).

Os inibidores de PLA<sub>2</sub> denominadas de *Inibidores de Fosfolipase A<sub>2</sub>* (PLI) são proteínas plasmáticas capazes de inibir a atividade de PLA<sub>2</sub>s. Os PLIs são glicoproteínas, oligoméricas, globulares e ácidas (LIZANO et al, 2003). De acordo com INOUE et. al (1991), THWIN et. al (2002) e LIZANO (2003), os PLIs são classificados em três classes de acordo com suas características estruturais. A primeira classe, conhecida como  $\alpha$  ( $\alpha$ PLI), tem como principal característica um domínio estrutural CRD (domínio de reconhecimento de carboidratos) similar ao de Lectinas Tipo-C, e que possivelmente reconhece e liga-se à PLA<sub>2</sub>, impedindo o efeito catalítico sobre a membrana celular. A segunda classe é conhecida por  $\beta$  ( $\beta$ PLI) e possui como principais características várias e sucessivas repetições ricas em leucinas, e quatro sítios de N-glicosilação. Segundo Okumura e colaboradores (1998), essa classe de proteínas possui uma homologia estrutural com a  $\alpha$ 2-glicoproteína humana.

Os inibidores da classe tipo gama ( $\gamma$ PLI) são os que apresentam o maior espectro de inibição frente às sPLA<sub>2</sub> (INOUE, 1997; FORTES-DIAS, 1999), e são reconhecidos por algumas características marcantes, como regiões ricas em prolina que mantém a conformação estrutural de sítios que permitem uma melhor interação com PLA<sub>2</sub>s (DUNM, 2001), e dois conjuntos de repetições intramoleculares de domínios ricos em cisteína, denominado motivo *Three-fingers* (OHKURA et al., 1999), que se assemelha com o receptor da uroquinase ativadora de plasminogênio (u-PAR) (DUNM, 2001).

Os primeiros estudos com inibidores de PLA<sub>2</sub> foram realizados com a finalidade de encontrar métodos alternativos para o tratamento de acidentes ofídicos. Com o entendimento funcional e o potencial farmacológico destas glicoproteínas, algumas pesquisas começaram a investigar o potencial dos inibidores para o desenvolvimento de novos modelos de fármacos na terapêutica contra diferentes doenças, como doenças inflamatórias, o câncer e doenças parasitárias (DONNINI et al., 2011; LIZANO et al., 2003; GIMENES et al., 2017)

Os inibidores desempenham um papel terapêutico por inibir a ação de PLA<sub>2</sub>, uma vez que estas enzimas produzem como produtos de suas reações ácidos graxos livres, como

o ácido araquidônico (AA) o qual é substrato de enzimas cicloxigenases que iniciam uma ampla cascata de reações enzimáticas que levam a produção de diferentes mediadores inflamatórios (DENNIS, et al., 2011; .XAVIER et al., 2017).

GIMENES e colaboradores (2014) isolaram e caracterizaram bioquimicamente um inibidor de PLA<sub>2</sub> do soro da serpente *Crotalus durissus collilineatus*, denominado  $\gamma$ CdcPLI. Essa proteína pertence à classe  $\gamma$  na classificação dos inibidores e apresenta massa molecular para cada monômero com o valor de 22,34 kDa. Estudos estruturais permitiram determinar a estrutura primária parcial do  $\gamma$ CdcPLI (GIMENES et al., 2014), bem como demonstraram por Dicroísmo Circular (CD) que o mesmo é composto por uma mistura de alfas-hélices e folhas beta pregueadas, sendo que 22% de alfas hélices e 29% de folhas beta. A partir de análises de Espalhamento Dinâmico da Luz (DLS), foi demonstrado que o  $\gamma$ CdcPLI é capaz de formar estruturas oligoméricas que aumentam em complexidade de acordo com o aumento da temperatura, ou seja, a cada aumento da temperatura a estrutura dobra o número de monômeros ligados (GIMENES et al., 2014). Funcionalmente os primeiros estudos com o  $\gamma$ CdcPLI demonstraram que este reconheceu e inibiu a função enzimática, citotóxica e miotóxica de PLA<sub>2</sub> presente nas peçonhas de serpentes reforçando assim seu potencial em inibir PLA<sub>2</sub>s de outras fontes biológicas.

Em 2017, Gimenes e colaboradores demonstraram os efeitos antitumorais, antimetastáticos e antiangiogênicos do  $\gamma$ CdcPLI nas células do câncer de mama. O  $\gamma$ CdcPLI foi mais citotóxico para células de câncer de mama altamente metastática (MDA-MB-231), quando comparado com as células de mama não tumorigênica, MCF 10A. O  $\gamma$ CdcPLI modulou a expressão gênica e proteica através da ativação de vias pró apoptóticas e inibição de vias relacionadas à sobrevivência celular, como a via do PI3K/AKT. Interessantemente, o  $\gamma$ CdcPLI inibiu a adesão e migração de células endoteliais humanas e bloqueou a angiogênese por diminuir a formação de vasos em células HUVEC (*in vitro*) e formação de prolongamentos celulares em modelo *ex vivo* de fragmento de aorta, além de reduzir a produção de fator de crescimento endotelial (VEGF). Segundo os autores desse trabalho, os efeitos de  $\gamma$ CdcPLI na via PI3K/AKT podem ser correlacionados com uma possível interação entre o inibidor e PLA<sub>2</sub> endógenas, levando a suas ações antitumoral, antimetastática e antiangiogênica *in vitro*. Dessa forma, o inibidor  $\gamma$ CdcPLI demonstrou um valioso potencial bioquímico para o uso como modelo farmacológico para terapia antitumoral, abrindo perspectivas para sua utilização como inibidor de PLA<sub>2</sub>s em processos biológicos onde essa classe de molécula esteja envolvida.

Há um grande interesse farmacológico em certas moléculas com atividade anticancerígena e seus derivados que demonstraram alguma reação contra alguns tipos de protozoários (KLINKERT et al 2006). Assim, vários desses agentes foram testados contra tripanossomatídeos e outros parasitas unicelulares (PEREZ et al 2008) Por outro lado, foi levantada a hipótese de que a citotoxicidade apresentada por diferentes drogas antitumorais contra parasitas protozoários pode estar relacionada ao fato de que esses parasitas e células cancerosas compartilham diversas semelhanças bioquímicas que afetam o metabolismo do DNA, vias de proteínas quinases, glicose enzimas de catabolismo e metabolismo de poliaminas (GANNAVARAM et al 2012 ). Além disso, o crescimento de parasitas tripanossomatídeos em seu hospedeiro e o de células cancerígenas apresentam pelo menos duas características comuns, sua capacidade mútua de rápida divisão celular e algumas estratégias de evasão imune e defesa (Singh et al 2004).

Diante do importante papel de PLA<sub>2</sub> endógenas no parasitismo, principalmente na leishmaniose, e do potencial inibitório do  $\gamma$ CdcPLI já demonstrados sobre diferentes tipos celulares, o presente estudo teve como objetivo principal avaliar a capacidade antiparasitária do  $\gamma$ CdcPLI sobre formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*. Estudos nessa área da biologia podem gerar novos conhecimentos e estratégias para o desenvolvimento racional de novos fármacos capazes de tratar doenças cujas terapias atuais trazem baixa eficácia e altos custos para a sociedade.

Perez, Jose M.; Fuertes, Miguel A.; Nguewa, Paul A.; Castilla, Josefina; Alonso, Carlos (2008). *Anticancer Compounds as Leishmanicidal Drugs: Challenges in Chemotherapy and Future Perspectives.* , 15(5), 433–439. doi:10.2174/092986708783503221

Singh, S., & Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 10(6), 307–315. <https://doi.org/10.1007/s10156-004-0348-9>

## 1.5 Referências

Alencar, Jamilah Lucena Santos et al. Investigação sorológica de *Leishmania* spp. em *Cerdocyon thous* e *Leopardus pardalis* no pantanal sul mato-grossense, Brasil. 2020. Link de acesso: <https://repositorio.ufpb.br/jspui/handle/123456789/17453>

Antoine, J.C.; Prina, E.; Courret, N.; Lang, T. *Leishmania* spp.: on the interactions they establish with antigen-presenting cells of their mammalian hosts. *Adv Parasitol.* 2004;58:1-68. doi: 10.1016/S0065-308X(04)58001-6. PMID: 15603761.

Anversa, L.; Tiburcio, M. G. S.; Richini-Pereira, V. B.; & Ramirez, L. E. (2018). Human leishmaniasis in Brazil: A general review. *Revista Da Associação Médica Brasileira*, 64(3), 281–289. doi:10.1590/1806-9282.64.03.281

Ássimos, Gabriela Ribeiro. Caracterização genética de cepas de *Leishmania* (*Viannia*) *braziliensis* provenientes de hospedeiros humanos, cães domésticos e pequenos mamíferos silvestres e sinantrópicos de Minas Gerais, Brasil. 2020. 117 f. Dissertação (Mestrado em Ciências - Área de concentração Biologia Celular e Molecular, Genética e Bioinformática) - Instituto René Rachou, Fundação Oswaldo Cruz, Programa de Pós-Graduação em Ciências da Saúde, Belo Horizonte, 2020.

Arni RK, Ward RJ. Phospholipase A2--a structural review. *Toxicon.* 1996 Aug;34(8):827-41. doi: 10.1016/0041-0101(96)00036-0. PMID: 8875770.

Bañuls, A.L.; Hide, M.; Prugnolle, F. *Leishmania* and the leishmaniasis: a parasite genetic update and advances in taxonomy, epidemiology and pathogenicity in humans. *Adv Parasitol.* 2007;64:1-109. doi: 10.1016/S0065-308X(06)64001-3. PMID: 17499100.

Bari, A.U.; Rahman, S.B. Many faces of cutaneous leishmaniasis. *Indian J Dermatol Venereol Leprol.* 2008 Jan-Feb;74(1):23-7. doi: 10.4103/0378-6323.38402. PMID: 18187818.

Barros, Neuza Biguinati Et Al. Fosfolipase A2-Asp-49 DE *Bothrops jararacussu* encapsulada em lipossomas como terapia alternativa para leishmaniose cutânea. 2017. - UFAM – UNIR <https://tede.ufam.edu.br/handle/tede/6298>

Brasil. Ministério Da Saúde. Secretaria De Vigilância Em Saúde. Departamento De Vigilância Epidemiológica. Manual de Vigilância da Leishmaniose Tegumentar Americana / Ministério da Saúde, Secretaria de Vigilância em Saúde, Departamento de

Vigilância Epidemiológica. – 2. ed. – Brasília : Editora do Ministério da Saúde, 2007. 182 p. – (Série A. Normas e Manuais Técnicos

Berg, J.M.; Stryer, L.; Tymoczko, J. L. Bioquímica 6ª ED. RIO DE JANEIRO: GUANABARA KOOGAN, 2008

Bronia, D.H.; Pereira, B.M.; Luján, H.D.; Fretes, R.E.; Fernández, A.; Paglini, P.A. Ganglioside treatment of acute *Trypanosoma cruzi* infection in mice promotes long-term survival and parasitological cure. *Ann Trop Med Parasitol*. 1999 Jun;93(4):341-50. doi: 10.1080/00034989958339. PMID: 10656035.

Bertello L.E.; Alves M.J.; Colli W.; de Lederkremer R.M. Evidence for phospholipases from *Trypanosoma cruzi* active on phosphatidylinositol and inositolphosphoceramide. *Biochem J*. 2000 Jan 1;345 Pt 1(Pt 1):77-84. PMID: 10600641; PMCID: PMC1220732.

Belaunzarán, M.L.; Velandia, A.; Lammel, E.M. Identification, cloning and expression of a novel Phospholipase A from *Leishmania braziliensis*. *Biocell*. 2010;34:p. 91.

Belaunzarán, M. L.; Lammel, E. M.; & de Isola, E. L. D. (2011). *Phospholipases A in Trypanosomatids*. *Enzyme Research*, 2011, 1–10. doi:10.4061/2011/392082

Bou, D.D.; Tempone, A.G.; Pinto, É.G.; Lago, J.H.; Sartorelli P. Antiparasitic activity and effect of casearins isolated from *Casearia sylvestris* on *Leishmania* and *Trypanosoma cruzi* plasma membrane. *Phytomedicine*. 2014 Apr 15;21(5):676-81. doi: 10.1016/j.phymed.2014.01.004. Epub 2014 Feb 18. PMID: 24560122.

Burke, J.E.; Dennis, E.A.; Phospholipase A2 biochemistry. *Cardiovasc Drugs Ther*. 2009 Feb;23(1):49-59. doi: 10.1007/s10557-008-6132-9. Epub 2008 Oct 18. PMID: 18931897; PMCID: PMC2823292.

Cupolillo, E.; Boité, M.C.; And Porrozzi, R. Considerações sobre a Taxonomia do Gênero *Leishmania*. In: CONCEIÇÃO-SILVA, F., and ALVES, C. R., comps. *Leishmanioses do*

continente americano [online]. Rio de Janeiro: Editora FIOCRUZ, 2014, pp. 39-51. ISBN 978-85-7541-568-9. <https://doi.org/10.7476/9788575415689.0003>.

Castillo, J.C.; Vargas, L.J.; Segura, C.; Gutiérrez, J.M.; Pérez, J.C. In vitro antiplasmodial activity of phospholipases A2 and a phospholipase homologue isolated from the venom of the snake *Bothrops asper*. *Toxins (Basel)*. 2012 Dec 14;4(12):1500-16. doi: 10.3390/toxins4121500. PMID: 23242318; PMCID: PMC3528259.

Cassaing, S.; Fauvel, J.; Bessières, M.H.; Guy, S.; Séguéla, J.P.; Chap H. *Toxoplasma gondii* secretes a calcium-independent phospholipase A(2). *Int J Parasitol*. 2000 Oct;30(11):1137-42. doi: 10.1016/s0020-7519(00)00101-6. PMID: 11027777.

Denny, P.W.; Field, M.C.; Smith, D.F.; GPI-anchored proteins and glycoconjugates segregate into lipid rafts in Kinetoplastida. *FEBS Lett*. 2001 Feb 23;491(1-2):148-53. doi: 10.1016/s0014-5793(01)02172-x. PMID: 11226438.

Denny, P.W.; Goulding, D.; Ferguson, M.A.; Smith, D.F. Sphingolipid-free *Leishmania* are defective in membrane trafficking, differentiation and infectivity. *Mol Microbiol*. 2004 Apr;52(2):313-27. doi: 10.1111/j.1365-2958.2003.03975.x. PMID: 15066023.

Dennis, E.A. Diversity of group types, regulation, and function of phospholipase A2. *J Biol Chem*. 1994 May 6;269(18):13057-60. PMID: 8175726.

Garcia Denegri M.E., Acosta OC, Huancahuire-Vega S, Martins-de-Souza D, Marangoni S, Maruñak SL, Teibler GP, Leiva LC, Ponce-Soto LA. Isolation and functional characterization of a new acidic PLA (2) Ba SpII RP4 of the *Bothrops alternatus* snake venom from Argentina. *Toxicon*. 2010 Aug 1;56(1):64-74. doi: 10.1016/j.toxicon.2010.02.031. Epub 2010 Mar 21. PMID: 20331996.

de Castro Côrtes L.M.; de Souza Pereira M.C.; de Oliveira F.O. Jr.; Corte-Real S.; da Silva, F.S.; Pereira, B.A.; de Fátima Madeira M.; de Moraes M.T.; Brazil, R.P.; Alves, C.R. *Leishmania (Viannia) braziliensis*: insights on subcellular distribution and

biochemical properties of heparin-binding proteins. *Parasitology*. 2012 Feb;139(2):200-7. doi: 10.1017/S0031182011001910. Epub 2011 Nov 7. PMID: 22053722.

De Souza Oliveira, Maiara et al. Potencial antileishmania, antimalárico e antitrypanossoma de espécies de *Casearia*: Uma revisão integrativa. *Research, Society and Development*, v. 10, n. 7, p. e34410716743-e34410716743, 2021

Díaz, C.; Gutiérrez, J.; Lomonte, B.; & Gené, J. (1991). The effect of myotoxins isolated from *Bothrops* snake venoms on multilamellar liposomes: relationship to phospholipase A<sub>2</sub>, anticoagulant and myotoxic activities. *Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Biomembranes*, 1070(2), 455–460. doi:10.1016/0005-2736(91)90086-n

Domont, G.B.; Perales, J.; Moussatché, H. Natural anti-snake venom proteins. *Toxicon*. 1991;29(10):1183-94. doi: 10.1016/0041-0101(91)90191-s. PMID: 1801313.

Donnini, S.; Finetti, F.; Francese, S.; Boscaro, F.; Dani, F.R.; Maset, F.; Frasson, R.; Palmieri M., Pazzagli M., De Filippis V., Garaci E., Ziche M. A novel protein from the serum of *Python sebae*, structurally homologous with type- $\gamma$  phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor, displays antitumour activity. *Biochem J*. 2011 Dec 1;440(2):251-62. doi: 10.1042/BJ20100739. PMID: 21834793.

Dunn, R.D.; Broady, K.W. Snake inhibitors of phospholipase A<sub>2</sub> enzymes. *Biochim Biophys Acta*. 2001 Aug 29;1533(1):29-37. doi: 10.1016/s1388-1981(01)00138-x. PMID: 11514233.

Fernandes, C.A.; Cardoso, F.F.; Cavalcante, W.G.; Soares, A.M.; Dal-Pai, M.; Gallacci, M; Fontes, MR. Structural Basis for the Inhibition of a Phospholipase A<sub>2</sub>-Like Toxin by Caffeic and Aristolochic Acids. *PLoS One*. 2015 Jul 20;10(7):e0133370. doi: 10.1371/journal.pone.0133370. PMID: 26192963; PMCID: PMC4508052.

Fernandes, A. C. Papel da Fosfolipase A<sub>2</sub> cálcio independente nas vias endocítica e exocítica de *Leishmania amazonensis* Dissertação (Mestrado em Ciências (Microbiologia)



do Instituto de Microbiologia Paulo de Góes da Universidade Federal do Rio de Janeiro.  
Julho de 2010

Fernandes, C.A.; Marchi-Salvador, D.P.; Salvador, G.M.; Silva, M.C.; Costa, T.R.; Soares, A.M.; Fontes, M.R. Comparison between apo and complexed structures of bothropstoxin-I reveals the role of Lys122 and Ca(2+)-binding loop region for the catalytically inactive Lys49-PLA(2)s. *J Struct Biol.* 2010 Jul;171(1):31-43. doi: 10.1016/j.jsb.2010.03.019. Epub 2010 Apr 4. PMID: 20371382.

Fortes-Dias, C.L.; Lin, Y.; Ewell, J.; Diniz, C.R.; Liu, T.Y. A phospholipase A2 inhibitor from the plasma of the South American rattlesnake (*Crotalus durissus terrificus*). Protein structure, genomic structure, and mechanism of action. *J Biol Chem.* 1994 Jun 3;269(22):15646-51. PMID: 8195214.

Fortes-Dias CL. Endogenous inhibitors of snake venom phospholipases A(2) in the blood plasma of snakes. *Toxicon.* 2002 May;40(5):481-4. doi: 10.1016/s0041-0101(01)00274-4. PMID: 11821118.

Gannavaram S, Debrabant A. Programmed cell death in *Leishmania*: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Front Cell Infect Microbiol.* 2012 Jul 10;2:95. doi: 10.3389/fcimb.2012.00095. PMID: 22919685; PMCID: PMC3417670.

Garcia Denegri, M. E.; Acosta, O. C.; Huancahuire-Vega, S.; Martins-de-Souza, D.; Marangoni, S.; Maruñak, S. L.; ... Ponce-Soto, L. A. (2010). *Isolation and functional characterization of a new acidic PLA2 Ba SpII RP4 of the Bothrops alternatus snake venom from Argentina. Toxicon, 56(1), 64–74.* doi:10.1016/j.toxicon.2010.02.031

Goulart I.M.B.; Penna, G.O.; Cunha, G. Imunopatologia da hanseníase: a complexidade dos mecanismos da resposta imune do hospedeiro ao *Mycobacterium leprae*. *Rev Bras Med Trop.* 2002, 35:365-75.

Gimenes, S.N.C.; Ferreira, F. B. ; Silveira, A. C. P. ; Rodrigues, R. S. ; Yoneyama, K. A. G. ; I.D.S, J ; Fontes, Marcos R. D.M. ; De Campos Brites, V. L. ; Santos, A. L. Q.

; Borges, M. H. ; Lopes, D. S. ; Rodrigues, V. M. . Isolation and biochemical characterization of a  $\gamma$ -type phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. *Toxicon*, v. 81, p. 58-66, 2014.

Gimenes, Sarah N. C.; Lopes, Daiana S. ; Alves, Patrícia T. ; Azevedo, Fernanda V. P. V. ; Vecchi, Lara ; Goulart, Luiz R. ; Rodrigues, Thais C. S. ; Santos, André L. Q. ; Brites, Vera L. De C. ; Teixeira, Thaise L. ; Da Silva, Cláudio V. ; Dias, Matheus H. ; Teixeira, Samuel C. ; Rodrigues, Renata S. ; Yoneyama, Kelly A. G. ; Oliveira, Ricardo A. ; Rodrigues, Veridiana de M. . Antitumoral effects of  $\gamma$ CdcPLI, a PLA2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. *Scientific Reports*, v. 7, p. 7077, 2017

Gimenes, S.N.C ; Aglas, L. ; Wildner, S. ; Huber, S. ; Silveira, A.C.P. ; Lopes, D.S. ; Rodrigues, R. S. ; Goulart, L. R. ; Briza, P. ; Ferreira, F. ; De Melo Rodrigues Á, V. ; Gadermaier, Gabriele . Biochemical and functional characterization of a new recombinant phospholipase A2 inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. *International Journal Of Biological Macromolecules*, v. 164, p. 1545-1553, 2020.

Hamza, T.; John, B.; Barnett, Bingyun L. I. Interleukin 12 a Key Immunoregulatory Cytokine in Infection Applications. *Int. J. Mol. Sci.*, 11(3): 789–806. 2010

Inbar, E.; Shaik, J.; Iantorno, S.; Romano, A.L.; Nzelu, C.O.; Owens, K. Whole genome sequencing of experimental hybrids supports meiosis-like sexual recombination in *Leishmania*. *Plos Genetics*. 15(5): e1008042, 2019

Inoue, S.; Shimada, A.; Ohkura, N.; Ikeda, K.; Samejima, Y.; Omori-Satoh. T.; Hayashi, K. Specificity of two types of phospholipase A2 inhibitors from the plasma of venomous snakes. *Biochem Mol Biol Int*. 1997 Mar;41(3):529-37. doi: 10.1080/15216549700201551. PMID: 9090460.

Kaye, P.M.; Cruz, I.; Picado, A.; Van, B. K.; Croft, S.L. Leishmaniasis immunopathology-impact on design and use of vaccines, diagnostics and drugs. *Semin Immunopathol*. 2020

Jun;42(3):247-264. doi: 10.1007/s00281-020-00788-y. Epub 2020 Mar 9. PMID: 32152715.

Klinkert MQ, Heussler V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. *Mini Rev Med Chem.* 2006 Feb;6(2):131-43. doi: 10.2174/138955706775475939. PMID: 16472182

Kini, R. M. (2005). *Structure–function relationships and mechanism of anticoagulant phospholipase A2 enzymes from snake venoms.* *Toxicon*, 45(8), 1147–1161. doi:10.1016/j.toxicon.2005.02.018

Kini, R.M. Phospholipase A2—a complex multifunctional protein puzzle. Em: KINI, R.M., (Ed.), *Enzymes: Structure, Function and Mechanism*, Ingleterra, p. 1–28, 1997

Krizaj, I.; Bieber, A. L.; Ritonja, A.; & Gubensek, F. (1991). *The primary structure of ammodytin L, a myotoxic phospholipase A2 homologue from Vipera ammodytes venom.* *European Journal of Biochemistry*, 202(3), 1165–1168. doi:10.1111/j.1432-1033.1991.tb16485.x

Lambeau, G.; Gelb, M.H. Biochemistry and physiology of mammalian secreted phospholipases A2. *Annu Rev Biochem.* 2008;77:495-520. doi: 10.1146/annurev.biochem.76.062405.154007. PMID: 18405237.

Lizano S., Domont G., Perales J. Natural phospholipase A(2) myotoxin inhibitor proteins from snakes, mammals and plants. *Toxicon.* 2003 Dec 15;42(8):963-77. doi: 10.1016/j.toxicon.2003.11.007. PMID: 15019494.

Leelayoova S., Siripattanapipong S., Manomat J., Piyaraj P., Tan-Ariya P., Bualert L., Mungthin M. Leishmaniasis in Thailand: A Review of Causative Agents and Situations. *Am J Trop Med Hyg.* 2017 Mar;96(3):534-542. doi: 10.4269/ajtmh.16-0604. Epub 2017 Apr 6. PMID: 28093539; PMCID: PMC5361524.

Lomonte, B., Angulo, Y., & Calderón, L. (2003). *An overview of lysine-49 phospholipase A2 myotoxins from crotalid snake venoms and their structural determinants of myotoxic action*. *Toxicon*, 42(8), 885–901. doi:10.1016/j.toxicon.2003.11.008

Lomonte, B., & Rangel, J. (2012). *Snake venom Lys49 myotoxins: From phospholipases A2 to non-enzymatic membrane disruptors*. *Toxicon*, 60(4), 520–530. doi:10.1016/j.toxicon.2012.02.007

Machado, P. R. L., Araújo, M. I. A. S., Carvalho, L., & Carvalho, E. M. (2004). *Mecanismos de resposta imune às infecções*. *Anais Brasileiros de Dermatologia*, 79(6), 647–662. doi:10.1590/s0365-05962004000600002

Mannan, S.B.; Elhadad, H.; Loc, T.T.H.; Sadik, M.; Mohamed, M.Y.F.; Nam, N.H.; Thuon, .N.D.; Hoang-Trong, B.L.; Duc, N.T.M.; Hoang, A.N.; Elhusseiny, K.M.; Minh, L.H.N.; Quynh, T.T.H.; Nghia, T.L.B.; Mai Nhu, Y.; Tieu, T.M.; Hirayama, K.; Huy, N.T.; Hamano, S. Prevalence and associated factors of asymptomatic leishmaniasis: a systematic review and meta-analysis. *Parasitol Int.* 2021 Apr;81:102229. doi: 10.1016/j.parint.2020.102229. Epub 2020 Nov 1. PMID: 33144197.

Marcussi S., Sant'Ana C.D., Oliveira C.Z., Rueda A.Q., Menaldo D.L., Belebani R.O., Stabeli RG, Giglio JR, Fontes MR, Soares AM. Snake venom phospholipase A2 inhibitors: medicinal chemistry and therapeutic potential. *Curr Top Med Chem.* 2007;7(8):743-56. doi: 10.2174/156802607780487614. PMID: 17456038.

Mesquita M.L., Desrivot J, Bories C, Fournet A, Paula JE, Grellier P, Espindola LS. Antileishmanial and trypanocidal activity of Brazilian Cerrado plants. *Mem Inst Oswaldo Cruz.* 2005 Nov;100(7):783-7. doi: 10.1590/s0074-02762005000700019. PMID: 16419337.

Mitropoulos, P.; Konidas, P.; Durkin-Konidas, M. New World cutaneous leishmaniasis: updated review of current and future diagnosis and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 2010 Aug;63(2):309-22. doi: 10.1016/j.jaad.2009.06.088. Epub 2010 Mar 19. PMID: 20303613.

Murakami, M.; Kudo, I; Phospholipase A2. *J Biochem.* 2002 Mar;131(3):285-92. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a003101. PMID: 11872155.

Naderer, T.; McConville M.J. The Leishmania-macrophage interaction: a metabolic perspective. *Cell Microbiol.* 2008 Feb;10(2):301-8. doi: 10.1111/j.1462-5822.2007.01096.x. Epub 2007 Dec 9. PMID: 18070117.

Narumi Aoki-Shioi and Cassandra M. Modahl (December 30th 2019). Snakebite Therapeutics Based on Endogenous Inhibitors from Vipers, *Medical Toxicology*, PinarErkekoglu and Tomohisa Ogawa, IntechOpen, DOI: 10.5772/intechopen.90625. Available from: <https://www.intechopen.com/chapters/70678>

Neves, D. P. *Parasitologia Humana*. 10 ed. – São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

Oliveira, Rafael Martins de. Galectina-3 desempenha um papel protetivo na infecção por *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. 2021. 58 f. Dissertação (Mestrado em Imunologia e Parasitologia Aplicadas) - Universidade Federal de Uberlândia, Uberlândia, 2021. <https://doi.org/10.14393/ufu.di.2021.188>

Okumura, K.; Ohkura, N.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. A novel phospholipase A2 inhibitor with leucine-rich repeats from the blood plasma of *Agkistrodon blomhoffii siniticus*. Sequence homologies with human leucine-rich alpha2-glycoprotein. *J Biol Chem.* 1998 Jul 31;273(31):19469-75. doi: 10.1074/jbc.273.31.19469. PMID: 9677367.

Ohkura, N.; Kitahara, Y.; Inoue, S.; Ikeda, K.; Hayashi, K. Isolation and amino acid sequence of a phospholipase A2 inhibitor from the blood plasma of the sea krait, *Laticauda semifasciata*. *J Biochem.* 1999 Feb;125(2):375-82. doi: 10.1093/oxfordjournals.jbchem.a022297. PMID: 9990137.

Ownby, C. L., Selistre de Araujo, H. S., White, S. P., & Fletcher, J. E. (1999). *Lysine 49 phospholipase A2 proteins*. *Toxicon*, 37(3), 411–445. doi:10.1016/s0041-0101(98)00188-3

Pan American Health Organization (PAHO). Leishmaniasis: Epidemiological Report in the Americas. Number 9, December 2020. Washington, D.C.: PAHO; 2020

Passero LF, Laurenti MD, Tomokane TY, Corbett CE, Toyama MH. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol Res.* 2008 Apr;102(5):1025-33. doi: 10.1007/s00436-007-0871-6. Epub 2008 Jan 8. PMID: 18180953.

Peng F, Du Q, Peng C, Wang N, Tang H, Xie X, Shen J, Chen J. A Review: The Pharmacology of Isoliquiritigenin. *Phytother Res.* 2015 Jul;29(7):969-77. doi: 10.1002/ptr.5348. Epub 2015 Apr 24. PMID: 25907962.

Polgár, J., Magnenat, E. M., Peitsch, M. C., Wells, T. N. C., & Clemetson, K. J. (1996). Asp-49 is not an absolute prerequisite for the enzymic activity of low-Mr phospholipases A2: purification, characterization and computer modelling of an enzymically active Ser-49 phospholipase A2, ecarpholin S, from the venom of *Echis carinatus sochureki* (saw-scaled viper). *Biochemical Journal*, 319(3), 961–968. doi:10.1042/bj3190961

Perez, Jose M.; Fuertes, Miguel A.; Nguewa, Paul A.; Castilla, Josefina; Alonso, Carlos (2008). *Anticancer Compounds as Leishmanicidal Drugs: Challenges in Chemotherapy and Future Perspectives.* , 15(5), 433–439. doi:10.2174/092986708783503221

Rogers, K. A.; Dekrey, G. K.; Mbow, M. L.; Gillespie R. D.; Brodskyn C. I; Titus R. G. Type 1 and type 2 responses to *Leishmania major*. *FEMS MicrobiolLett*: 209:1– 7, 2002.

Rufini, S., Cesaroni, P., Desideri, A., Farias, R., Gubensek, F., Gutierrez, J. M., ... Pedersen, J. Z. (1992). *Calcium ion independent membrane leakage induced by phospholipase-like myotoxins.* *Biochemistry*, 31(49), 12424–12430. doi:10.1021/bi00164a018

Santos, José Carlos Dos. Plantas medicinais com ação contra leishmaniose cutânea: uma revisão integrativa. 2021. RI FAMAM. BACHARELADO EM FARMÁCIA. Link de acesso: <http://131.0.244.66:8082/jspui/handle/123456789/2190>

Santos-Filho, N. A., & Santos, C. T. (2017). *Alpha-type phospholipase A2 inhibitors from snake blood. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 23(1). doi:10.1186/s40409-017-0110-2

Soares, A.M.; Marcussi, S.; Stábeli, R.G.; França S.C.; Giglio, J.R.; Ward, R.J.; Arantes, E.C. Structural and functional analysis of BmjMIP, a phospholipase A2 myotoxin inhibitor protein from Bothrops moojeni snake plasma. *Biochem Biophys Res Commun*. 2003 Mar 7;302(2):193-200. doi: 10.1016/s0006-291x(03)00155-4. PMID: 12604331.

Singh, S., & Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 10(6), 307–315. <https://doi.org/10.1007/s10156-004-0348-9>

Souto, X. M. (2013). *Participação da autofagia na interação Toxoplasma gondii-célula hospedeira* (Doctoral dissertation).

Silva, M.; Pacheco, W. L.; & Sauerbier, G. (2021). O Gerenciamento Ambiental E Seu Impacto Na Leishmaniose. *Revista Multidisciplinar Em Saúde*, 2(3), 61. <https://doi.org/10.51161/remms/1466>

Silveira, A. C. P.; Gimenes, S. N. C.; Barbaresco, L. F.; Carvalho, C. P.; Bueno, J. P. R.; Guimarães, E. C.; & Ávila, V. D. M. R. (2021). Antimicrobial effect of bothropstoxin-i in broilers. *Semina: Ciências Agrárias*, 42(1), 267-282. <http://dx.doi.org/10.5433/1679-0359.2021v42n1p267>

Trinchieri, G. Interleukin-10 production by effector T cells: Th1 cells show self control. *J Exp Med*. 2007 Feb 19;204(2):239-43. doi: 10.1084/jem.20070104. Epub 2007 Feb 12. PMID: 17296790; PMCID: PMC2118719.

Thwin, M.M.; Gopalakrishnakone, P.; Kini, R.M.; Armugam, A.; Jeyaseelan, K. Recombinant antitoxic and antiinflammatory factor from the nonvenomous snake Python

reticulatus: phospholipase A2 inhibition and venom neutralizing potential. *Biochemistry*. 2000 Aug 8;39(31):9604-11. doi: 10.1021/bi000395z. PMID: 10924158.

Tsai, I.H.; Wang, Y.M.; Chen, Y.H.; Tsai, T.S.; Tu, M.C. Venom phospholipases A2 of bamboo viper (*Trimeresurus stejnegeri*): molecular characterization, geographic variations and evidence of multiple ancestries. *Biochem J*. 2004 Jan 1;377(Pt 1):215-23. doi: 10.1042/BJ20030818. PMID: 12959640; PMCID: PMC1223832.

Veitonmäki T, Murtola TJ, Määttänen L, Taari K, Stenman UH, Tammela TL, Auvinen A. Use of non-steroidal anti-inflammatory drugs and prostate cancer survival in the Finnish prostate cancer screening trial. *Prostate*. 2015 Sep;75(13):1394-402. doi: 10.1002/pros.23020. Epub 2015 Jun 12. PMID: 26073992.

Weise F, Stierhof YD, Kühn C, Wiese M, Overath P. Distribution of GPI-anchored proteins in the protozoan parasite *Leishmania*, based on an improved ultrastructural description using high-pressure frozen cells. *J Cell Sci*. 2000 Dec;113 Pt 24:4587-603. PMID: 11082051.

Winstead MV, Balsinde J, Dennis EA. Calcium-independent phospholipase A(2): structure and function. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 31;1488(1-2):28-39. doi: 10.1016/s1388-1981(00)00107-4. PMID: 11080674

Yedgar S, Lichtenberg D, Schnitzer E. Inhibition of phospholipase A(2) as a therapeutic target. *Biochim Biophys Acta*. 2000 Oct 31;1488(1-2):182-7. doi: 10.1016/s1388-1981(00)00120-7. PMID: 11080687.



## **CAPITULO 2**

### **Artigo científico**

Antileishmanial effects of  $\gamma$ CdcPLI, a Phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum on *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Gonçalves, N.M.<sup>1\*</sup>, Lopes, D.S.<sup>1,3\*</sup>; Teixeira, S.C.<sup>2</sup>, Freitas, V.<sup>1</sup>, Costa, T. R.<sup>1</sup>; Gimenes, S.N.C.<sup>1</sup>; Azevedo, F. V.<sup>1</sup>; Carregosa, L.<sup>3</sup>; Queiroz, V.<sup>3</sup>, Teixeira, T.L.<sup>4</sup>; da Silva, C. V.<sup>2</sup>; Rodrigues, R.S.<sup>1</sup>; Yoneyama, K.A.G.<sup>1</sup>; Clissa, P. B.<sup>5</sup>; Rodrigues, V.M.<sup>1#</sup>

<sup>1</sup>Laboratory of Biochemistry and Animal Toxins, Institute of Biotechnology, Federal University of Uberlandia (UFU), Uberlândia-MG, Brazil; <sup>2</sup>Department of Immunology, Institute of Biomedical Sciences, Federal University of Uberlândia (UFU), Uberlândia-MG, Brazil; <sup>3</sup>Institute of Biosciences, Federal University of Bahia (UFBA), Vitória da Conquista, BA, Brazil; <sup>4</sup>Department of Microbiology, Immunology and Parasitology, Paulista School of Medicine, Federal University of São Paulo, São Paulo, SP, Brazil; <sup>5</sup>Laboratory of Immunopathology, Institute of Butantan, São Paulo, SP, Brazil.

\*These authors contributed equally to this work

#Corresponding author: Prof. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

## Abstract

The neglected human diseases caused by *Leishmania* parasite are treated with drugs associated with high toxicity and cost, parasite resistance and limited efficacy. Therefore, the development of new strategies for treatment of the leishmaniasis is essential and snake serums are natural compounds with potential to yield novel drugs. The aim of this study was evaluating the effects of  $\gamma$ CdcPLI, a phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum, on viability and parasite-macrophage interaction of *Leishmania (Leishmania) amazonensis* promastigotes forms. Viability assay was performed on macrophages and promastigotes cultivated in absence (control) or presence of increasing doses of  $\gamma$ CdcPLI (0.78–100  $\mu$ g/mL) up to 24 h by MTT assay. For invasion assay into macrophages, promastigotes were previously incubated for 1 h in presence (10 and 50 $\mu$ g/mL) or absence of  $\gamma$ CdcPLI (control), and next were added onto monolayer macrophages and incubated at 37°C in a CO<sub>2</sub> incubator for 4h. The invasion assay was also performed with macrophages previously incubated for 1 h in the presence or absence of  $\gamma$ CdcPLI. In addition, we evaluated the effect of  $\gamma$ CdcPLI (10 $\mu$ g/mL) on the proliferation of *L. (L.) amazonensis* amastigotes by 72 hours. Finally, we evaluated the interference of the  $\gamma$ CdcPLI in the cell cycle progression of promastigotes treated with the inhibitor.  $\gamma$ CdcPLI presented cytotoxic activity against promastigotes at 25, 50 and 100  $\mu$ g/mL, reducing the parasite's viability to 20%, 45% and 80%, respectively. Interestingly, the phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor reduced Macrophages C57 viability by only 30% at 50  $\mu$ g/mL concentration.  $\gamma$ CdcPLI (10 and 50  $\mu$ g/mL) interfered with the invasion capacity of promastigotes (previously incubated with  $\gamma$ CdcPLI) in peritoneal macrophages, causing statistically significant reductions of parasites number. In addition, when the macrophages were previously incubated with  $\gamma$ CdcPLI the invasion parasite capacity also showed significant reductions.  $\gamma$ CdcPLI also interfered with the process of proliferation of amastigote forms of the parasite and the treatment of promastigotes with  $\gamma$ CdcPLI (50 $\mu$ g/mL) promoted a significant arrest in G1 phase and decreased the percentage of parasites at G2/M phase. Our results demonstrate that the  $\gamma$ CdcPLI is an important tool for the discovery of new targets on parasite, as well as an alternative compound to improve the effectiveness of leishmaniasis treatment.

**Key words:** phospholipase A<sub>2</sub>, *Leishmania*, Inhibitor, amastigote

## 1. Introduction

Leishmaniasis is a set of complex and multifaceted syndromes, with different clinical manifestations, caused by protozoa of the species of the genus *Leishmania spp.*[1]. It has a wide distribution worldwide, but most cases occur in the American, Asian, and African continents. According to the Pan American Health Organization (PAHOS) [2], leishmaniasis affected 18 countries in America in 2019, with Brazil being the country with the most notifications, about 15,000 cases [2].

*Leishmania* can cause damage to skin, mucosa, and visceral organs. The main forms are Cutaneous Leishmaniasis (CL), Diffuse Cutaneous Leishmaniasis (CLD), Mucocutaneous Leishmaniasis (CML) and Visceral Leishmaniasis (LV) [3][4]. The most common clinical form is cutaneous leishmaniasis (CL), while visceral leishmaniasis (VL) is the most severe form and almost always fatal if left untreated [5].

Cutaneous leishmaniasis is a widespread tropical infection caused by numerous different species of *Leishmania* protozoan that are transmitted by sandflies. Among them, highlights the subspecies *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, which is an important protozoan that affects skin, causing ulcers characteristic of cutaneous leishmaniasis [6] [7] [8].

Drug therapy for all forms of leishmaniasis aims to ensure adherence to treatment, alleviate symptoms caused by the disease, safely administer indicated medications, control and/or minimize the occurrence of adverse effects [9]. Currently, therapy against leishmaniasis is based on the use of five drugs: pentavalent antimonials, amphotericin B and its liposomal formulation, miltefosine, paromomycin and pentamidine. Except for

antimonial compounds, all other drugs were not initially developed with leishmanicidal action. Furthermore, they are associated with serious deficiencies such as toxicity, prolonged administration, and possible emergence of resistance by the parasite [10].

The complexity of leishmaniasis symptoms is largely a result of the parasite's virulence, which among several actions can induce responses in the host cell, such as changes in lipid metabolism that to lead to plasma membrane remodelling by membrane phospholipid turnover, then modulating the process of adhesion and invasion of the parasite [11]. In this context, studies have reported that the secretion of endogenous phospholipases presents in protozoa such as *Trypanosoma cruzi* and *L. (L.) amazonensis* increase the penetration of parasites into host cells [12][13][14][15].

Literature findings have demonstrated the role of different molecules with anti-phospholipase action on leishmaniasis. Bordon and collaborators [16] assessed the leishmanicidal effects of the phospholipase A<sub>2</sub> (PLA<sub>2</sub>) inhibitors, methyl arachidonyl fluoronate, bromoenol lactone and aristolochic acid using *in vitro* and *in vivo* experimental models. The mentioned inhibitors were cytotoxic to promastigote and amastigote forms of *L. (L.) amazonensis* and were not toxic to peritoneal macrophages from BALB/c mice. Moreover, the PLA<sub>2</sub> inhibitor bromoenol lactone decreased lesion size and skin parasitism in infected BALB/c mice [16].

Borges *et al.* [17] demonstrated that anti-PLA<sub>2</sub>-BnSP-7 IgY antibodies from egg yolks of hens immunized with BnSP-7, a LysPLA<sub>2</sub> isolated from *Bothrops pauloensis* venom, were cytotoxic to *Toxoplasma gondii* tachyzoite and *L. (L.) amazonensis* promastigotes, as well as they were able to decrease proliferation of both parasites treated before infection and inhibited the invasion of promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*. Additionally, anti-PLA<sub>2</sub>-BnSP-7 IgY antibodies recognized targets in *L. (L.) amazonensis* and *T. gondii* extracts by ELISA and immunofluorescence assays [17].

$\gamma$ CdcPLI, a PLA<sub>2</sub> inhibitor isolated from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum, has been explored for its therapeutic properties [18][19][20][38]. It was firstly isolated, and chemically characterized as an oligomeric protein with 23kDa by monomer, capable of inhibiting PLA<sub>2</sub>-induced biological activities such as edema and myotoxicity [18].  $\gamma$ CdcPLI showed interesting antitumor and antiangiogenic properties, since it was able to modulate important mediators of apoptosis pathways such as p53, MAPK-ERK, BIRC5 and MDM2 and interfered in MDA-MB-231 breast cancer cells adhesion, migration and invasion [19]. This protein blocked angiogenesis by decreasing vessel formation in HUVEC cells *in vitro* and formation of cell extensions in an *ex vivo* model of aortic fragment. In addition to reducing the production of endothelial growth factor (VEGF), the  $\gamma$ CdcPLI interfered in PI3K/AKT pathway, suggesting a possible interaction between the inhibitor and endogenous PLA<sub>2</sub>s [19].

There is pharmacological interest in certain molecules with anticancer activity and their derivatives that have demonstrated some reaction against some types of protozoa [20]. Thus, several of these agents have been tested against trypanosomatids and other unicellular parasites. [21] On the other hand, it was hypothesized that the cytotoxicity presented by different antitumor drugs against protozoan parasites may be related to the fact that these parasites and cancer cells share several biochemical similarities that affect DNA metabolism, protein kinase pathways, glucose catabolism enzymes and polyamine metabolism [22]. In addition, the growth of trypanosomatid parasites in their host and that of cancer cells have at least two common characteristics, their mutual ability to rapidly divide cells and some strategies of immune evasion and defense [23]

Currently, a very interesting review demonstrated the potential therapeutic targets in leishmaniasis [24] This study as well as others showed different proteins in Leishmania parasites, among them PLA<sub>2</sub>s and phospholipase C (PLC), which can be involved in

Leishmania parasites virulence and maintenance in vertebrate hosts  
[16][25][26][27][28][29][30]

Since endogenous PLA<sub>2</sub>s can be involved in parasite virulence and maintenance in vertebrate hosts, they can be considered as a possible target for studies that aim to better understand the parasite infection process in leishmaniasis. Thus, the present study aimed to demonstrate, for the first time, the cytotoxicity effects of  $\gamma$ CdcPLI on proliferation and infectivity of *L. (L.) amazonensis* promastigotes. The results of this study can open novel windows for investigating in depth the pathogenesis of the parasitic disease, as well as for the development of new therapeutic approaches for leishmaniasis.

## **2. Material and methods**

### **2.1 *C. d. collilineatus* serum and *Bothrops pauloensis* crude venom**

The serum of *C. d. collilineatus* was obtained from specimens maintained in the Reptiles Sector of the Federal University of Uberlândia, Minas Gerais, Brazil. This serpentarium was registered in the Brazilian Institute of Environment and Renewable Natural Resources – IBAMA (n° 301286). The snake blood was collected periodically, and the serum was obtained by centrifugation at 5000 *g* for 10 min at 4°C. The serum was stored at -20°C. *Bothrops pauloensis* crude venom was collected from snake kept at the Ceta serpentarium, Animal Toxin Extraction Center, Ltda. – CNPJ: 08.972.260/0001–30, Morungaba, SP, Brazil. This serpentarium has obtained proof of IBAMA registration and use of renewable natural resources (n° 2,087163).

### **2.2 Isolation of PLA<sub>2</sub> inhibitor from *C. d. collilineatus* serum ( $\gamma$ CdcPLI)**

PLA<sub>2</sub> inhibitor was purified from *C. d. collilineatus* serum by two sequential chromatographic steps. First, 98 mg of serum was dissolved into 1 ml 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.2 M NaCl and applied on a Q-Sepharose column (GE Healthcare - United Kingdom) previously equilibrated with the same buffer. Fractions (Q1 to Q5), eluted with 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) with crescent concentrations of NaCl (0.2 M, 0.35 M, 0.5 M, and 0.7 M) at a flow rate of 12 ml/h at room temperature, were monitored at Abs 280 nm (spectrophotometer Ultrospec 1000 UV/visible, Pharmacia Biotech -United States). Fractions were lyophilized and stored at -20°C.

Q4 fraction (8,5 mg) with inhibitory activity on phospholipases A<sub>2</sub> (data not shown) was further submitted to an NHS Hitrap (N-hydroxysuccinimide) affinity column immobilized with PLA<sub>2</sub> BnSP-7 [18]. Affinity column was equilibrated with 10 mM Tris-HCl buffer (pH 7.5), and the inhibitor was eluted, with 100 mM glycine-HCl buffer (pH 2.0). Fractions of 1 ml/tube were collected at a flow rate of 0.1 ml/min using an AKTA prime plus (Amersham Biosciences - United Kingdom). pH of the eluted samples was immediately adjusted with 1 M Tris-HCl buffer (pH 8.0).

The protein concentration was determined using Bradford (1976) assay and the homogeneity of protein was assessed by 12.5% Sodium Dodecyl Sulfate-Polyacrylamide Gel Electrophoresis (SDS-PAGE) according to Laemmli (1970) [31].

### **2.3 Inhibition of PLA<sub>2</sub> activity**

The PLA<sub>2</sub> assay was determined according to De Haas and Postema (1968) [32]. Phospholipase activity was measured using egg yolk as a substrate in the presence of 0.03 M sodium deoxycholate and 0.6 M CaCl<sub>2</sub>. To evaluate the inhibitory effect of  $\gamma$ CdcPLI on PLA<sub>2</sub> activity, the inhibitor  $\gamma$ CdcPLI was incubated with *B. pauloensis* venom at different



venom: $\gamma$ CdcPLI (m/m) ratios for 30 min at 37°C. Results were in triplicate and expressed in mEqNaOH/mg/min.

#### **2.4 Cell culture and parasite maintenance**

Immortalized bone marrow-derived macrophages from C57BL/6mice (macrophages C57) were obtained using the protocol described by ARAUJO et al. [33] *Leishmania (L.) amazonensis* promastigotes (IFLA/BR/67/- PH8) were maintained in Brain Heart Infusion—HiMedia medium supplemented with 10% fetal bovine serum (Cultilab, Campinas, Brazil), 100 mg of gentamicin/mL and 2 mM L-glutamine (GibcoBRL, Life Technologies, New York), at 26°C. Promastigotes in the stationary phase (metacyclic) were used in the experiments.

#### **2.5 Cellular viability in promastigote forms of *L. (L.) amazonensis***

Cytotoxicity assays in the presence or absence of  $\gamma$ CdcPLI were performed on promastigote forms by the MTT assay. Promastigotes ( $1 \times 10^5$  parasites/well) were placed in 96-well culture plates and incubated in two fold serial dilution of  $\gamma$ CdcPLI from 100 to 0.781  $\mu$ g/mL for 24 h at 23 °C. Control parasites were incubated negatively with PBS. After 24 h, promastigotes were incubated with 5 mg/mL MTT (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl tetrazolium bromide) for 3 h at 37 °C. Formazan crystals were dissolved by adding 100 $\mu$ L of PBS containing 10% SDS and 0.01 M HCl and after 18 h, the absorbance was measured in a multi-well scanning spectrophotometer (MultiskanGO, Thermo Scientific) at 570 nm. Three independent experiments were performed in quadruplicate.

## 2.6 Cellular viability in macrophages C57

Cell viability in the presence of the inhibitor  $\gamma$ CdcPLI was evaluated in macrophages C57 by a colorimetric assay, based on the mitochondrial oxidation of the MTT reagent (3-[4,5- dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide; thiazolyl tetrazole). Briefly, cells were cultured in 96-well plates ( $3 \times 10^4$  cells / 200  $\mu$ L / well) in complete medium for 24 h at 37 °C and 5% CO<sub>2</sub>. Then, cells were treated with different concentrations of  $\gamma$ CdcPLI (100  $\mu$ g/mL to 0.781  $\mu$ g/mL) by serial two fold dilutions in RPMI 1640 medium. After 24 h, supernatants were discarded and 10  $\mu$ L of MTT (5 mg/mL) and 90  $\mu$ L of 10% FBS medium were added to each well for 3 h, under the same culture conditions. Subsequently, formazan crystals were dissolved by adding 100 $\mu$ L of PBS containing 10% SDS and 0.01 M HCl and, after 18 h, the optical density was determined at 570 nm on a plate reader. Results were expressed as the percentages of viable cells in relation to untreated control (100% viability). This assay was performed in triplicate.

## 2.7 Cell cycle analysis

Cell cycle was analysed by quantifying the DNA content as previously described Crissman et al [34] and Krishan et al [35]. Exponentially growing promastigotes of *Leishmania (L) amazonensis* ( $1.0 \times 10^6$  cells/well) were plated in 96-well micro-plates and were treated with  $\gamma$ CdcPLI (10 and 50  $\mu$ g/mL) or culture medium (control group) for 24 h at 27 °C. Then, cells were harvested and fixed in 70% ethanol overnight at 4 °C. To ensure that only the DNA was stained, cells were incubated with RNase A (100  $\mu$ g/mL) and propidium iodide (PI) (10  $\mu$ g/mL) in the dark for 45 minutes at 37 °C. Cell cycle was

analysed by a FACSCantoII (BD), and the data were obtained using FlowJo software (version 7.6.3).

## 2.8 Invasion assay

Macrophages C57 ( $5 \times 10^5$  cells/well) were cultured in a 24-well plate containing 13 mm coverslips in each well. After adhesion, the cells were submitted to two distinct experimental models: (i) macrophages C57 were pre-treated or not with 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$  of  $\gamma\text{CdcPLI}$  for 24 h, and then infected with *L. (L.) amazonensis* promastigotes, with a multiplicity of infection (MOI) of 10 parasites per 1 cell, for 4 h at 26°C; (ii) Promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis* (with a MOI of 10:1) were pre-treated or not with 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$  of  $\gamma\text{CdcPLI}$  for 1 h, and allowed to invade the cells for 4 h at 26°C. For both protocols, cells were fixed with Bouin's solution (HT10132 Sigma Aldrich) and stained with Giemsa (1:20 – P3288 Sigma Aldrich) [33]. Finally, the coverslips were analysed under a light microscope to assess the following parameters: number of cells with invaded parasites and total number of parasites invaded to these cells in a total of 200 cells examined randomly. Three independent experiments were performed in triplicate for each treatment approach.

## 2.9 Statistical analysis

Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation (S.D.) of experiments performed at least three times in triplicate. All data were first checked for normal distribution. Significance differences were determined by one-way ANOVA, two-way ANOVA with

multiple comparisons of Bonferroni test, (GraphPad Prism Software version 6.01). Data were considered statistically significant at  $p < 0.05$ .

### 3. Results and Discussion

#### 3.1 Isolation of PLA<sub>2</sub> inhibitor from *C. d. collilineatus* serum ( $\gamma$ CdcPLI)

In the present work, we described for the first time the antileishmanial effects induced by  $\gamma$ CdcPLI isolated from *C. d. collilineatus* snake serum. Initially, we isolated  $\gamma$ CdcPLI according to Gimenes and colleagues [18] by two chromatography steps by ion exchange chromatography on Q-Sepharose and by affinity column NHS Hitrap (N-hydroxysuccinimide) immobilized with the PLA<sub>2</sub> BnSP-7 (Figs. 1A and 1B). Affinity chromatography has been employed by other authors to isolate different classes of inhibitors [36][37]. The success of this method is related to the specificity and purity of the isolated proteins [34];[35];[36];[37];[18]).

The fractionation of *C. d. collilineatus* (Cdc) serum on a Q-Sepharose Fast Flow column produced five major protein peaks, called Q1 to Q5 (Fig. 1A). The inhibitory effect of all fractions on PLA<sub>2</sub> activity was assayed (data not shown). The Q4 fraction, showed the best inhibition level (data not shown). Then, Q4 fraction was subjected to an affinity column of NHS Hitrap (N- hydroxysuccinimide) immobilized with PLA<sub>2</sub> BnSP-7, resulting in two fractions, NHS-1 and NHS-2 (Fig. 1B). NHS-2 fraction, which contains the  $\gamma$ CdcPLI, showed homogenous with a unique peak and a single band with a *Mr* of approximately 23kDa (Fig. 1C). This protein represented 0,5% of the Cdc serum and was able to inhibit 58.25% the PLA<sub>2</sub> activity induced by *B. pauloensis* crude snake venom at ratio 1:5 (*B. pauloensis* venom:  $\gamma$ CdcPLI, m/m) (Fig. 1D). This capacity of  $\gamma$ PLIs in inhibiting PLA<sub>2</sub> activities has already been described in the current literature. Oliveira et al [35] showed that the  $\gamma$ BjussuMIP isolated from *B. jararacussu* plasma was able to inhibit edema, myotoxic, cytotoxic and bactericidal effects induced by bothropic PLA<sub>2</sub>s. Gimenes

and colleagues [18] showed the efficiency of the inhibitory  $\gamma$ CdcPLI against acidic and basic Asp-49 PLA<sub>2</sub>s (BpPLA<sub>2</sub>-TXI and BthTX-II, respectively).

### **3.2 $\gamma$ CdcPLI decreases the viability of promastigotes forms of *L. (L.) Amazonensis* and macrophages C57**

The viability assays were performed on macrophages and promastigotes forms cultivated in absence (control) or presence of increasing doses of  $\gamma$ CdcPLI (0.78–100  $\mu$ g/mL) for 24 h by MTT assay. We observed significant cytotoxicity differences between the control and 25 to 100  $\mu$ g/mL ( $p < 0.05$ , Fig. 2A) on promastigotes viability. At 25, 50 and 100  $\mu$ g/mL we obtained 80%, 45% and 20% of parasite's viability, respectively. We did not observe statistical difference between the lowest concentrations in relation to control. These results suggest that there is an ideal concentration to cause a better effect on promastigote forms of *L. (L.) amazonensis*.

$\gamma$ CdcPLI reduced the viability of macrophages C57 by only 30% at 50  $\mu$ g/mL concentration (Fig. 2B). The result showed that  $\gamma$ CdcPLI was more cytotoxic to promastigotes forms at 50  $\mu$ g/mL, when compared to macrophages at the same concentration (Fig. 2C). Antileishmanial activity induced by PLA<sub>2</sub> inhibitors has been described in the literature. Alvarez and collaborators [39] showed the anti-proliferative effect induced by Imidazolidin-2-one derivatives compounds against *L. (L.) infantum* promastigotes. The most active derivative Imidazolidin-2-one showed an important activity ( $IC_{50} = 9.9 \mu$ M) against the clinically relevant stage of parasites in comparison with Glucantime® ( $IC_{50} = 464.5 \mu$ M); and did not induce toxicity on human fibroblast cells ( $IC_{50} = 102 \mu$ M). This same study suggested that imidazolidin-2-one compounds have a

direct antiparasitic effect through a perturbation of phospholipid membrane homeostasis and by inhibiting the parasite protein kinase C (PKC), an important enzyme that regulates early events of the parasite-macrophage interaction process [38]. Another study demonstrated that the compounds Bromoenol lactone an inhibitor of calcium-independent PLA<sub>2</sub>, and methyl arachidonyl fluorophosphate, which is a selective and irreversible inhibitor of cytosolic PLA<sub>2</sub> and calcium-independent PLA<sub>2</sub> induced cytotoxicity to 50% of promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* at  $15.1 \pm 3.7 \mu\text{M}$  and  $50.5 \pm 7.8 \mu\text{M}$ , respectively. Moreover, these PLA<sub>2</sub> inhibitors did not also induce cytotoxicity to peritoneal macrophages [16], similarly this effect was also observed by  $\gamma\text{CdcPLI}$  up to  $25 \mu\text{g/mL}$  (Figs. 2B and 2C).

### **3.3 $\gamma\text{CdcPLI}$ promoted cell cycle arrest in G1 phase and reduction in G2/M phase in promastigote forms of *L. (L.) amazonensis***

Our previous results demonstrated that  $\gamma\text{CdcPLI}$  was able to interfere in parasite's viability. Thus, we aimed to assess the impact of  $\gamma\text{CdcPLI}$  treatment on cell cycle progression of promastigotes forms of *L. (L.) amazonensis*. Promastigotes were treated or not with 10 and 50  $\mu\text{g/mL}$  of  $\gamma\text{CdcPLI}$  for 24 hours, and the DNA content was analysed by flow cytometry. Our results demonstrated that  $\gamma\text{CdcPLI}$  promoted a significant augmentation in the G1 phase at 50  $\mu\text{g/mL}$  and decrease in the G2/M phase at 24 h post-treatment (Fig. 3A). The proportion of cells in G1 phase increased from 50% in control to 60% and decrease from 20% in control to 5% in the G2 phase after treatment with  $\gamma\text{CdcPLI}$  at 50  $\mu\text{g/mL}$ , respectively (Fig. 3). Treatment with 50  $\mu\text{g/mL}$  of  $\gamma\text{CdcPLI}$  probably caused a variety of reactions (needs more studied) that allowed a significant

reduction (compared to the control) of the (S) phase of DNA synthesis, which consequently significantly altered the next phase (G2) marked by the synthesis of proteins that they will be needed for the next phase of the cycle and by the duplication of organelles and in the (M) phase mitosis and subsequent cytokinesis [39].

Thus, we suggest that the accumulation of cells in G1 phase observed when promastigotes were treated with  $\gamma$ CdcPLI could be inducing cell cycle arrest by affecting certain cell cycle regulatory proteins. After DNA damage, cell cycle checkpoints can prevent progression to the next phase of the cell cycle until the damage is repaired, thus ensuring that mutations resulting from DNA damage are not passed on to daughter generations [40] [41]. Corroborating with our data, similarly findings have been demonstrated by other natural or synthetic compounds with antileishmanial activities against different genus of *Leishmania* [42][43][44]

### **3.4 $\gamma$ CdcPLI interferes directly in the infective capacity of promastigote forms and modulates the host cell environment**

In order to gain insights into the anti-*Leishmania* activity of  $\gamma$ CdcPLI, we verify the capacity of this protein to interfere in the parasite's ability to invade the host cells. For this purpose, we assessed whether  $\gamma$ CdcPLI would be able to target the parasites and/or the cells, by the treating of the promastigotes and macrophages before infection. Our data showed that the pre-treatment of promastigote forms of *L. (L.) amazonensis* with  $\gamma$ CdcPLI (10 and 50  $\mu$ g/ mL) for 1h reduced the number of intracellular parasites, as well as the percentage of infected cells in comparison with the untreated control group ( $p < 0.05$ ; Figs. 4A and 4B). Moreover, the previously treatment of macrophages C57 with both concentrations of  $\gamma$ CdcPLI also impaired the parasite's capacity to invade host cells by a reducing in the percentage of parasite-infected macrophages C57 ( $p < 0.05$ ; Fig. 4B), and



consequently decreased the number of invaded parasites when compared to the control group ( $p < 0.05$ ; Fig. 4A).

Several prokaryotic and eukaryotic pathogens produce PLA<sub>2</sub>s that not only function as an important virulence factor, but also have been associated with the penetration process responsible for entering into host cells and implicated in many intracellular mechanisms [11]

Thardin and colleagues [45] reported the role of parasite and host cell phospholipases in eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *T.gondii* invasion. The authors showed that the pre-treatment of tachyzoites with PLA<sub>2</sub> inhibitors (e.g., 4-p-bromophenacyl bromide and quinacrine), in the absence of calcium in the culture medium, culminated in a reduction of parasite invasion into macrophages. Moreover, the activities of the cyclooxygenase and lipoxygenase pathways were down modulated when macrophages were pre-treated with these PLA<sub>2</sub> inhibitors, which led the authors to suggest that the parasites activated the host cell phospholipase A<sub>2</sub> [46].

*Leishmania* spp. are intracellular protozoans capable of scavenging glycerophospholipids from host cells and degrade them *via* the activity PLA<sub>2</sub>, suggesting that these parasites can remodel exogenous lipids into their own *via* the Lands cycle [47][48][49][50][11]. Degrading activities of PLA<sub>2</sub>s were also reported in *L. major*, and they could be involved in the biosynthesis of lipophosphoglycan, the main macromolecule on the surface of the procyclic promastigotes [51] The modification of phospholipid composition of infected macrophages has been described, with increasing levels of lysophosphatidylcholine, an effect that may reflect indirectly, the action of endogenous/parasite PLA<sub>2</sub> on the macrophage [52]

Passero and colleagues [53] demonstrated that macrophages infected with *L. (L.) amazonensis* treated with PLA<sub>2</sub> had more intracellular amastigotes when compared to the control group. Furthermore, this study showed an association between intracellular parasitism and PGE<sub>2</sub> production by infected macrophages.

The involvement of PLA<sub>2</sub> can be considered an additional mechanism by which *L. (L.) amazonensis* parasites infect, modulate inflammation and persist in the host, suggesting that the inhibition of this molecule can bring elucidation about important targets about the parasite and host interaction [52][53][54][55][56]. In this way, these findings are in accordance with our work, which can bring new antileishmanial approaches to understanding the role endogenous or parasite PLA<sub>2</sub>s in parasitism.

In summary, our data indicate that  $\gamma$ CdcPLI has a direct effect on parasites, since that this protein was highly toxic against promastigote forms, culminating in a reduction of the parasite invasion rate. Even though the mechanism of action of  $\gamma$ CdcPLI appears to target the parasites, an additional and non-exclusive hypothesis to explain the impact of this inhibitor against *L. (L.) amazonensis* could involve the modulation of the host cell environment, since that previously treatment of macrophages also impaired the parasite infection.

#### **4. Conclusion**

The present study demonstrated, for the first time, the antileishmanial effects of  $\gamma$ CdcPLI, a PLA<sub>2</sub> inhibitor isolated from *C. durissus collilineatus* snake serum against *L.(L.) amazonensis*.  $\gamma$ CdcPLI was cytotoxicity against the parasites, probably induced changes in its life cycle and interfered in the invasion of parasite into host cells. Thus, our results provide evidence of the potential use of PLA<sub>2</sub> inhibitors as interesting approaches to

study the pathogenesis of infectious diseases, as well as a model for the discovery of relevant targets in parasites and/or host cells for the design of new compounds capable of treating parasitic illness.

**Acknowledgments:** The authors thank Federal University of Uberlândia (UFU), Brazil and the Brazilian funding agencies, CNPq, CAPES and FAPEMIG, for providing financial support to this study: FAPEMIG (CBB - APQ-01401-17) and National Institute of Science and Technology in Theranostics and Nanobiotechnology INCT-TeraNano-CNPq/CAPES/FAPEMIG, Grant numbers CNPq-465669/2014-0, CAPES: 88887.136343/2017-00 and FAPEMIG: APQ-03613-17).

**Conflicts of Interest:** The authors declare no conflict of interest.

## References

- [1] Leelayoova, S.; Siripattanapipong, S.; Manomat, J.; Piyaraj, P.; Tan-Ariya, P.; Bualert, L.; & Mungthin, M. (2017). Leishmaniasis in Thailand: A Review of Causative Agents and Situations. *The American journal of tropical medicine and hygiene*, 96(3), 534–542. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.16-0604>
- [2] Organização Pan-Americana Da Saúde (OPAS/OMS). (2019). Leishmanioses: Informe Epidemiológico das Américas. Organização Pan-Americana da Saúde
- [3] Kevric, I.; Cappel, M. A.; & Keeling, J. H. (2015). *New World and Old World Leishmania Infections. Dermatologic Clinics*, 33(3), 579–593. doi:10.1016/j.det.2015.03.018.
- [4] Vasconcelos, J. M. G.; Sousa, C. G.; Teixeira, A.; A. B. & Lima, J. M. (2018). Leishmaniose tegumentar americana: perfil epidemiológico, diagnóstico e tratamento. *RBAC*. 50, 221- 7. DOI: 10.21877/2448-3877.201800722
- [5] World Health Organization (WHO) (2021) Leishmaniasis. Access <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/leishmaniasis>
- [6] Grevelink, S.A.; Lerner, E.A. Leishmaniasis. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Feb;34(2 Pt 1):257-72. doi: 10.1016/s0190-9622(96)80121-6. PMID: 8642091.
- [7] Aronson, N.E.; Joya, C.A. Cutaneous Leishmaniasis: Updates in Diagnosis and Management. *Infect Dis Clin North Am*. 2019 Mar;33(1):101-117. doi: 10.1016/j.idc.2018.10.004. PMID: 30712756.
- [8] Garrido-Jareño, M.; Sahuquillo-Torralba, A.; Chouman-Arcas, R.; Castro-Hernández, I.; Molina-Moreno, J.M.; Llavador-Ros, M.; Gómez-Ruiz, M.D.; López-Hontangas, J.L.; Botella-Estrada, R.; Salavert-Lleti, M.; Pemán-García, J. Cutaneous and mucocutaneous leishmaniasis: experience of a Mediterranean hospital. *Parasit Vectors*. 2020 Jan 13;13(1):24. doi: 10.1186/s13071-020-3901-1. PMID: 31931865; PMCID: PMC6958673.
- [9] Brasil, Ministério da Saúde. (2018). Manejo Terapêutico de Pacientes com Leishmaniose Tegumentar Americana (LTA). Santa Catarina, 13 p. Disponível em <<http://www.dive.sc.gov.br/conteudos/publicacoes/ManualLTAvisualiza%C3%A7%C3%A3o.pdf>>.
- [10] Tiwari, N.; Gedda, M. R.; Tiwari, V. K.; Singh, S. P.; & Singh, R. K. (2017). *Limitations of Current Therapeutic Options, Possible Drug Targets and Scope of Natural Products in Control of Leishmaniasis. Mini-Reviews in Medicinal Chemistry*, 18(1). doi:10.2174/13895575176661704251

- [11] Pawlowic, M.C.; Zhang, K. Leishmania parasites possess a platelet-activating factor acetylhydrolase important for virulence. *Mol Biochem Parasitol.* 2012 Nov;186(1):11-20. doi: 10.1016/j.molbiopara.2012.08.005. Epub 2012 Aug 28. PMID: 22954769; PMCID: PMC3492548.
- [12] Saffer, L.D.; Long, K. S.A.; Schwartzman, J.D. The role of phospholipase in host cell penetration by *Toxoplasma gondii*. *Am J Trop Med Hyg.* 1989 Feb;40(2):145-9. doi: 10.4269/ajtmh.1989.40.145. PMID: 2919724.
- [13] Belaunzarán, M.L.; Velandia, A.; Lammel, E.M. et al. Identification, cloning and expression of a novel Phospholipase A from *Leishmania braziliensis*. *Biocell.* 2010;34:p. 91.
- [14] Belaunzarán, M. L.; Lammel, E. M., & de Isola, E. L. D. (2011). *Phospholipases A in Trypanosomatids. Enzyme Research, 2011, 1–10.* doi:10.4061/2011/392082
- [15] Cassaing, S.; Fauvel, J.; Bessières, M.-H.; Guy, S.; Séguéla, J.-P.; & Chap, H. (2000). *Toxoplasma gondii secretes a calcium-independent phospholipase A 2. International Journal for Parasitology, 30(11), 1137–1142.* doi:10.1016/s0020-7519(00)00101-6
- [16] Bordon, M. L. A. C.; Laurenti, M. D.; Ribeiro, S. P.; Toyama, M. H.; Toyama, D. de O.; & Passero, L. F. D. (2018). *Effect of phospholipase A2 inhibitors during infection caused by Leishmania (Leishmania) amazonensis. Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases, 24(1).* doi:10.1186/s40409-018-0156-9
- [17] Borges, I.P.; Silva, M.F.; Santiago, F.M.; de Faria, L.S.; Júnior, Á.F.; da Silva, R.J.; Costa, M.S.; de Freitas, V.; Yoneyama, K.A.G.; Ferro, E.A.V.; Lopes, D.S.; Rodrigues, R.S.; de Melo Rodrigues, V. Antiparasitic effects induced by polyclonal IgY antibodies anti-phospholipase A<sub>2</sub> from *Bothrops pauloensis* venom. *Int J Biol Macromol.* 2018 Jun;112:333-342. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2018.01.178. Epub 2018 Jan 31. PMID: 29391226.
- [18] Gimenes, S.N.; Ferreira, F.B.; Silveira, A.C.; Rodrigues, R.S.; Yoneyama, K.A.; Izabel Dos Santos, J.; Fontes, M.R.; de Campos Brites, V.L.; Santos, A.L.; Borges, M.H.; Lopes, D.S.; Rodrigues, V.M. Isolation and biochemical characterization of a  $\gamma$ -type phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. *Toxicon.* 2014 Apr;81:58-66. doi: 10.1016/j.toxicon.2014.01.012. Epub 2014 Feb 8. PMID: 24513130.
- [19] Gimenes, S.N.C.; Lopes, D.S.; Alves, P.T.; Azevedo F.V.P.V.; Vecchi, L.; Goulart, L.R.; Rodrigues, T.C.S.; Santos, A.L.Q.; Brites, V.L.C.; Teixeira, T.L.; da Silva, C.V.; Dias, M.H.; Teixeira, S.C.; Rodrigues, R.S.; Yoneyama, K.A.G.; Oliveira, R.A.; Rodrigues, V.M. Antitumoral effects of  $\gamma$ CdcPLI, a PLA<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* via PI3K/Akt pathway on MDA-MB-231 breast cancer cell. *Sci Rep.* 2017 Aug 1;7(1):7077. doi: 10.1038/s41598-017-07082-2. PMID: 28765552; PMCID: PMC5539153.

- [20] Klinkert MQ, Heussler V. The use of anticancer drugs in antiparasitic chemotherapy. *Mini Rev Med Chem*. 2006 Feb;6(2):131-43. doi: 10.2174/138955706775475939. PMID: 16472182.
- [21] Perez, Jose M.; Fuertes, Miguel A.; Nguewa, Paul A.; Castilla, Josefina; Alonso, Carlos (2008). *Anticancer Compounds as Leishmanicidal Drugs: Challenges in Chemotherapy and Future Perspectives*. , 15(5), 433–439. doi:10.2174/092986708783503221
- [22] Gannavaram S, Debrabant A. Programmed cell death in Leishmania: biochemical evidence and role in parasite infectivity. *Front Cell Infect Microbiol*. 2012 Jul 10;2:95. doi: 10.3389/fcimb.2012.00095. PMID: 22919685; PMCID: PMC3417670.
- [23] Singh, S., & Sivakumar, R. (2004). Challenges and new discoveries in the treatment of leishmaniasis. *Journal of infection and chemotherapy : official journal of the Japan Society of Chemotherapy*, 10(6), 307–315. <https://doi.org/10.1007/s10156-004-0348-9>
- [24] Gimenes, S.N.C.; Aglas, L.; Wildner, S.; Huber, S.; Silveira, A.C.P.; Lopes, D.S.; Rodrigues, R.S.; Goulart, L.R.; Briza, P.; Ferreira, F.; de Melo Rodrigues, Á.V.; Gadermaier, G. Biochemical and functional characterization of a new recombinant phospholipase A<sub>2</sub> inhibitor from *Crotalus durissus collilineatus* snake serum. *Int J Biol Macromol*. 2020 Dec 1;164:1545-1553. doi: 10.1016/j.ijbiomac.2020.07.221. Epub 2020 Jul 28. PMID: 32735921.
- [25] Rashidi, S.; Fernández-Rubio, C.; Manzano-Román, R.; Mansouri, R.; Shafiei, R.; Ali-Hassanzadeh, M.; Barazesh, A.; Karimazar, M.; Hatam, G.; Nguewa, P. Potential therapeutic targets shared between leishmaniasis and cancer. *Parasitology*. 2021 May;148(6):655-671. doi: 10.1017/S0031182021000160. Epub 2021 Feb 4. PMID: 33536086.
- [26] Moudy, R.; Manning, T.J.; Beckers, C.J. The loss of cytoplasmic potassium upon host cell breakdown triggers egress of *Toxoplasma gondii*. *J Biol Chem*. 2001 Nov 2;276(44):41492-501. doi: 10.1074/jbc.M106154200. Epub 2001 Aug 28. PMID: 11526113.
- [27] Dorlo, T.P.; Eggelte, T.A.; de Vries, P.J.; Beijnen, J.H. Characterization and identification of suspected counterfeit miltefosine capsules. *Analyst*. 2012 Mar 7;137(5):1265-74. doi: 10.1039/c2an15641e. Epub 2012 Jan 18. PMID: 22251969..
- [28] Rashidi, S.; Nguewa, P.; Mojtahedi, Z.; Shahriari, B.; Kalantar, K.; Hatam, G. Identification of immunoreactive proteins in secretions of *Leishmania infantum* promastigotes: an immunoproteomic approach. *East Mediterr Health J*. 2020 Dec 9;26(12):1548-1555. doi: 10.26719/emhj.20.114. PMID: 33355395.
- [29] Ramazzotti, G.; Faenza, I.; Follo, M.Y.; Fiume, R.; Piazzini, M.; Giardino, R.; Fini, M.; Cocco, L. Nuclear phospholipase C in biological control and cancer. *Crit Rev Eukaryot*

Gene Expr. 2011;21(3):291-301. doi: 10.1615/critreveukargeneexpr.v21.i3.50. PMID: 22111715.

[30] Lattanzio, R.; Piantelli, M.; Falasca, M. Role of phospholipase C in cell invasion and metastasis. *Adv Biol Regul.* 2013 Sep;53(3):309-18. doi: 10.1016/j.jbior.2013.07.006. Epub 2013 Jul 18. PMID: 23925006.

[31] Cai, S.; Sun, P.H.; Resaul, J.; Shi, L.; Jiang, A.; Satherley, L.K.; Davies, E.L.; Ruge, F.; Douglas-Jones, A.; Jiang, W.G.; Ye, L. Expression of phospholipase C isozymes in human breast cancer and their clinical significance. *Oncol Rep.* 2017 Mar;37(3):1707-1715. doi: 10.3892/or.2017.5394. Epub 2017 Jan 20. PMID: 28112359.

[32] Laemmli UK. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature.* 1970 Aug 15;227(5259):680-5. doi: 10.1038/227680a0. PMID: 5432063.

[33] de Haas, G.H.; Postema, N.M.; Nieuwenhuizen, W.; van Deenen, L.L. Purification and properties of phospholipase A from porcine pancreas. *Biochim Biophys Acta.* 1968 Apr 24;159(1):103-17. doi: 10.1016/0005-2744(68)90248-9. PMID: 4967810.

[34] de Araújo, K.C.L.; Teixeira, T.L.; Machado, F.C.; da Silva, A.A.; Quintal, A.P.N.; da Silva, C.V. AFAP-1L1-mediated actin filaments crosslinks hinder *Trypanosoma cruzi* cell invasion and intracellular multiplication. *Acta Trop.* 2016 Oct;162:167-170. doi: 10.1016/j.actatropica.2016.06.028. Epub 2016 Jun 24. PMID: 27349187.

[35] Crissman, H.A.; Steinkamp, J.A. Rapid, simultaneous measurement of DNA, protein, and cell volume in single cells from large mammalian cell populations. *J Cell Biol.* 1973 Dec;59(3):766-71. doi: 10.1083/jcb.59.3.766. PMID: 4128323; PMCID: PMC2109119.

[36] Krishan, A. Rapid flow cytofluorometric analysis of mammalian cell cycle by propidium iodide staining. *J Cell Biol.* 1975 Jul;66(1):188-93. doi: 10.1083/jcb.66.1.188. PMID: 49354; PMCID: PMC2109516.

[37] da Silva, C.V.; Kawashita, S.Y.; Probst, C.M.; Dallagiovanna, B.; Cruz, M.C.; da Silva, E.A.; Souto-Padrón, T.C.; Krieger, M.A.; Goldenberg, S.; Briones, M.R.; Andrews N.W.; Mortara, R.A. Characterization of a 21kDa protein from *Trypanosoma cruzi* associated with mammalian cell invasion. *Microbes Infect.* 2009 Apr;11(5):563-70. doi: 10.1016/j.micinf.2009.03.007. Epub 2009 Apr 1. PMID: 19344784.

[38] Oliveira, C. Z.; Menaldo, D. L.; Marcussi, S.; Santos-Filho, N. A.; Silveira, L. B.; Boldrini-França, J., ... Soares, A. M. (2010). *Corrigendum to "An a-type phospholipase A2 inhibitor from Bothrops jararacussu snake plasma: Structural and functional characterization" [Biochimie 90 (2008) 1506–1514]. Biochimie, 92(4), 423.* doi:10.1016/j.biochi.2010.01.012

[39] Oliveira, C.Z.; Santos-Filho, N.A.; Menaldo, D.L.; Boldrini-Franca, J.; Giglio, J.R.; Calderon, L.A.; Stabeli, R.G.; Rodrigues, F.H.; Tasic, L.; da Silva, S.L.; Soares, A.M.

Structural and functional characterization of a  $\gamma$ -type phospholipase A2 inhibitor from bothrops jararacussu snake plasma. *Curr Top Med Chem*. 2011;11(20):2509-19. doi: 10.2174/156802611797633465. PMID: 21682685.

[40] Santos-Filho, N.A.; Fernandes, C.A.; Menaldo, D.L.; Magro, A.J.; Fortes-Dias, C.L.; Estevão-Costa, M.I.; Fontes, M.R.; Santos, C.R.; Murakami, M.T.; Soares, A.M. Molecular cloning and biochemical characterization of a myotoxin inhibitor from *Bothrops alternatus* snake plasma. *Biochimie*. 2011 Mar;93(3):583-92. doi: 10.1016/j.biochi.2010.11.016. Epub 2010 Dec 7. PMID: 21144879.

[41] Lizano, S.; Angulo, Y.; Lomonte, B.; Fox J.W.; Lambeau, G.; Lazdunski, M.; Gutiérrez, J.M. Two phospholipase A2 inhibitors from the plasma of *Cerrophidion* (*Bothrops*) *godmani* which selectively inhibit two different group-II phospholipase A2 myotoxins from its own venom: isolation, molecular cloning and biological properties. *Biochem J*. 2000 Mar 15;346 Pt 3(Pt 3):631-9. PMID: 10698689; PMCID: PMC1220895.

[42] Campos, P. C.; De Melo, L. A.; Dias, G. L. F.; & Fortes-Dias, C. L. (2016). Endogenous phospholipase A2 inhibitors in snakes: a brief overview. *Journal of Venomous Animals and Toxins Including Tropical Diseases*, 22(1). doi:10.1186/s40409-016-0092-5

[43] Alvarez, N.; Robledo, S.; Velez, I. D.; Robert, J. M.; Baut, G. L.; & Pape, P. L. (2002). *Inhibition of Parasite Protein Kinase C by New Antileishmanial Imidazolidin-2-one Compounds*. *Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry*, 17(6), 443–447. doi:10.1080/1475636021000005749

[44] Souto-Padrón, T.; Lima, A.P.; Ribeiro, R.D.E.O. Effects of dibucaine on the endocytic/exocytic pathways in *Trypanosoma cruzi*. *Parasitol Res*. 2006 Sep;99(4):317-20. doi: 10.1007/s00436-006-0192-1. Epub 2006 Apr 13. PMID: 16612626.

[45] Senturk, E.; & Manfredi, J. J. (2012). *p53 and Cell Cycle Effects After DNA Damage*. *P53 Protocols*, 49–61. doi:10.1007/978-1-62703-236-0\_4

[46] Antwi, C. A.; Amisigo, C. M.; Adjimani, J. P.; & Gwira, T. M. (2019). *In vitro activity and mode of action of phenolic compounds on Leishmania donovani*. *PLOS Neglected Tropical Diseases*, 13(2), e0007206. doi:10.1371/journal.pntd.0007206

[47] Sen, R.; Bandyopadhyay, S.; Dutta, A.; Mandal, G.; Ganguly, S.; Saha, P.; Chatterjee, M. Artemisinin triggers induction of cell-cycle arrest and apoptosis in *Leishmania donovani* promastigotes. *J Med Microbiol*. 2007 Sep;56(Pt 9):1213-1218. doi: 10.1099/jmm.0.47364-0. PMID: 17761485.

[48] Chandrasekaran, S.; Dayakar, A.; Veronica, J.; Sundar, S.; Maurya, R. An in vitro study of apoptotic like death in *Leishmania donovani* promastigotes by withanolides.



Parasitol Int. 2013 Jun;62(3):253-61. doi: 10.1016/j.parint.2013.01.007. Epub 2013 Feb 14. PMID: 23416156.

[49] Ghosh, P.; Mandal, A.; Dey, S.; Pal, C. Synthesis and in vitro Screening of 29, 30-Dibromo-28-oxoallobetulin against Parasitic Protozoans, *Leishmania donovani* and *Leishmania Major*. Indian J Pharm Sci. 2015 Mar-Apr;77(2):202-7. doi: 10.4103/0250-474x.156596. PMID: 26009654; PMCID: PMC4442470.

[50] Thardin, J.F.; M'Rini, C.; Beraud, M.; Vandaele, J.; Frisach, M.F.; Bessieres, M.H.; Seguela, J.P.; Pipy, B. Eicosanoid production by mouse peritoneal macrophages during *Toxoplasma gondii* penetration: role of parasite and host cell phospholipases. Infect Immun. 1993 Apr;61(4):1432-41. doi: 10.1128/iai.61.4.1432-1441.1993. PMID: 8454347; PMCID: PMC281382.

[51] Das, S.; Castillo, C.; Stevens, T. (2001). Phospholipid remodeling/generation in *Giardia*: the role of the Lands cycle. *Trends Parasitol.* 17 (7), 316–319. doi: 10.1016/S1471-4922(01)01901-8

[52] Henriques, C.; Atella, G. C.; Bonilha, V. L.; De Souza W. (2003). Biochemical analysis of proteins and lipids found in parasitophorous vacuoles containing *Leishmania amazonensis*. *Parasitol. Res.* 89 (2), 123–133. doi: 10.1007/s00436-002-0728-y

[53] Parodi-Talice, A.; Araujo, J. M.; Torres, C.; Perez-Victoria, J. M.; Gamarro, F.; Castanys, S. (2003). The over expression of a new ABC transporter in *Leishmania* is related to phospholipid trafficking and reduced infectivity. *Biochim. Biophys. Acta* 1612 (2), 195–207. doi: 10.1016/S0005-2736(03)00131-7

[54] Castanys-Munoz, E.; Alder-Baerens, N.; Pomorski, T.; Gamarro, F.; Castanys, S. (2007). A novel ATP-binding cassette transporter from *Leishmania* is involved in transport of phosphatidylcholine analogues and resistance to alkyl-phospholipids. *Mol. Microbiol.* 64 (5), 1141–1153. doi: 10.1111/j.1365-2958.2007.05653.x

[55] Smith, T. K.; Milne, F. C.; Sharma, D. K.; Crossman, A.; Brimacombe, J. S.; & Ferguson, M. A. J. (1997). *Early steps in glycosylphosphatidylinositol biosynthesis in Leishmania major*. *Biochemical Journal*, 326(2), 393–400. doi:10.1042/bj3260393

[56] Passero, L.F.; Laurenti, M.D.; Tomokane, T.Y.; Corbett, C.E.; Toyama, M.H. The effect of phospholipase A2 from *Crotalus durissus collilineatus* on *Leishmania (Leishmania) amazonensis* infection. *Parasitol Res.* 2008 Apr;102(5):1025-33. doi: 10.1007/s00436-007-0871-6. Epub 2008 Jan 8. PMID: 18180953.

[57] Farrell, J.P.; Kirkpatrick, C.E. Experimental cutaneous leishmaniasis. II. A possible role for prostaglandins in exacerbation of disease in *Leishmania major*-infected BALB/c mice. *J Immunol.* 1987 Feb 1;138(3):902-7. PMID: 3100619.

[58]Dennis, E. A.; Cao, J.; Hsu, Y.-H.; Magrioti, V.; & Kokotos, G. (2011). Phospholipase A2Enzymes: Physical Structure, Biological Function, Disease Implication, Chemical Inhibition, and Therapeutic Intervention. *Chemical Reviews*, 111(10), 6130–6185. doi:10.1021/cr200085w

[59] de Moraes, C.G.; Castro, L.A.K.; Terra, R.; dos Santos, R.F.; Da-Silva, S.A.; Dutra, P.M. The Dialogue of the Host-Parasite Relationship: *Leishmania* spp. and *Trypanosoma cruzi* Infection. *Biomed Res Int*. 2015;2015:324915. doi: 10.1155/2015/324915. Epub 2015 May 18. PMID: 26090399; PMCID: PMC4450238.

[60] Arango, Duque. G.; Descoteaux, A. *Leishmania* survival in the macrophage: where the ends justify the means. *Curr Opin Microbiol*. 2015 Aug;26:32-40. doi: 10.1016/j.mib.2015.04.007. Epub 2015 May 17. PMID: 25988701.

**Figures:**

**FIGURE 1**

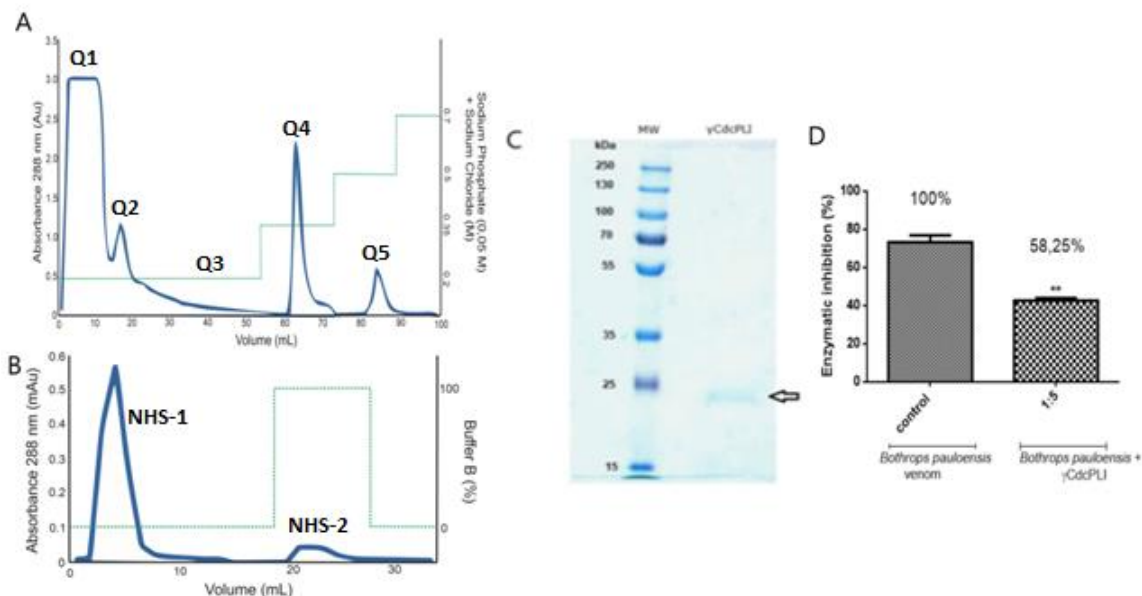


Figure 1: Isolation of  $\gamma$ CdcPLI from *C. d. Collilineatus* snake serum. (A) 98 mg of lyophilized serum was dissolved in 1 ml of 0.05 M sodium phosphate buffer (pH 6.5) containing 0.2 M NaCl, applied to ion exchange chromatography (Q-Sepharose), equilibrated and eluted with buffer 0.05 M sodium phosphate with different NaCl concentrations (0.2M, 0.35M, 0.5M and 0.7M) at a flow rate of 12.0 ml/h at 25 C. (B) NHS-Hitrap affinity chromatography (N- hydroxysuccinimide) coupled with BnSP-7 of Q4 fraction (8,7 mg) in (Buffer A: 10 mM Tris-HCl buffer, pH 7.5; Buffer B: 100 mM glycine-HCl buffer, pH 2.0). (C) 12.5% (w/v) SDS-PAGE of  $\gamma$ CdcPLI: MW: Molecular weight markers (250 kDa, 130 kDa, 100 kDa, 70 kDa, 55 kDa, 35 kDa, 25 kDa and 15 kDa). The arrow indicates the isolated protein. (D) PLA<sub>2</sub> activity inhibition, (*B. pauloensis* venom:  $\gamma$ CdcPLI, 1:5,w/w). NHS-2 fraction (0,5 mg) contains the  $\gamma$ CdcPLI inhibitor, according to Gimenes et al [18]. Statistical analyses: value significantly different from control was indicated by  $p < 0,01$  (\*\*) (Fig. 1D)

FIGURE 2

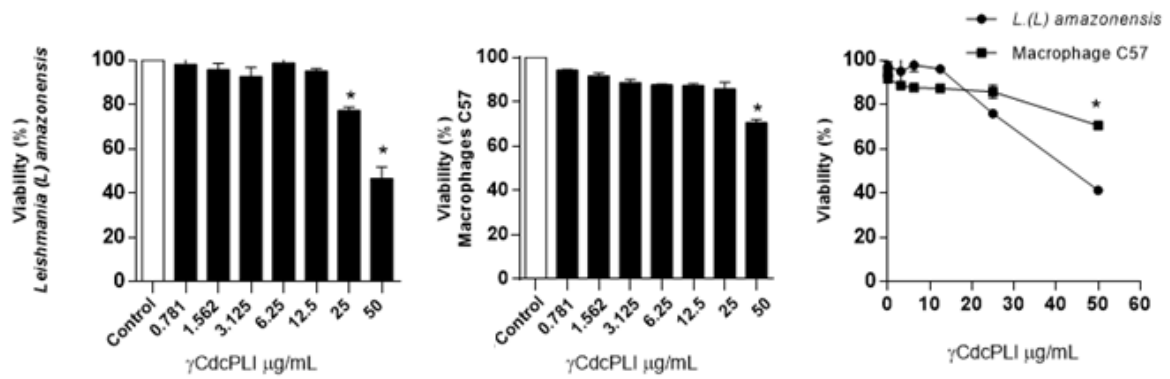


Figure 2: Effects of  $\gamma$ CdcPLI inhibitor on the viability of Macrophages C57 and *L.(L) amazonensis* promastigotes. For the positive controls of viability, cells and parasites were treated only with RPMI and LIT medium, respectively. (A) *L.(L) amazonensis* viability assay with  $\gamma$ CdcPLI inhibitor treatments ranging from 0.781 to 100  $\mu$ g/mL for 24 hours. (B) Cell viability of macrophages C57 with  $\gamma$ CdcPLI treatments (ranging from 0.781 to 50  $\mu$ g/mL) for 24 hours. Significant differences between the positive control of viability and the treatments with  $\gamma$ CdcPLI (\* $p$  < 0.05; One-way ANOVA).

FIGURE 3

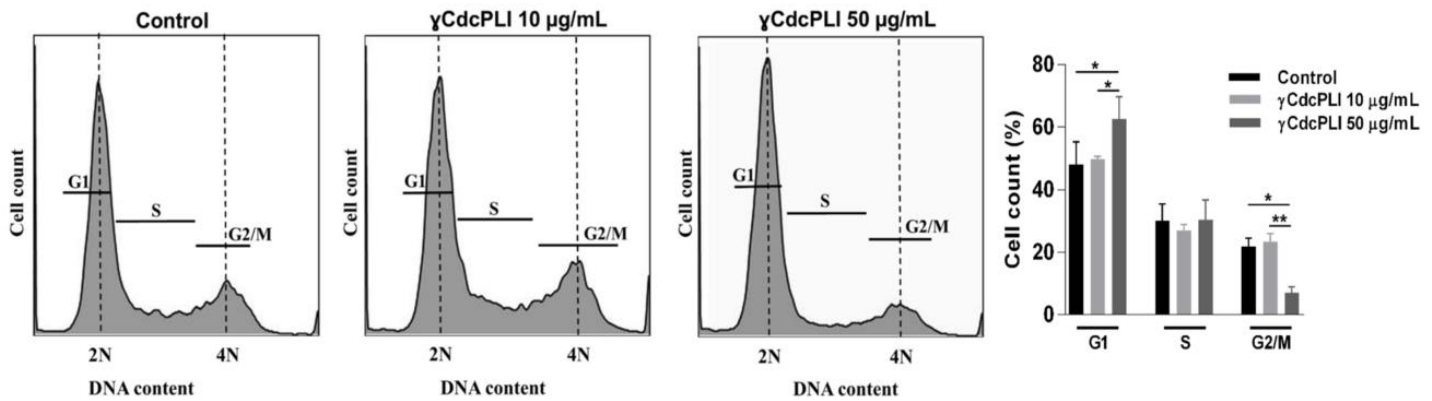


Figure 3: Effects of  $\gamma$ CdcPLI on *L. (L.) amazonensis* cell cycle.  $\gamma$ CdcPLI promoted a significant augmentation in the G1 phase at 50  $\mu$ g/mL and decreased the cell percentage in the G2/M phase at 24 h post-treatment. Data are expressed as mean  $\pm$  standard deviation. Significant differences were determined using one-way ANOVA and Tukey's multiple comparisons test. Differences were considered statistically significant when \*p < 0.05 and \*\*p < 0.005 when compared with the control. Experiments were performed at least three times independently in triplicates.

FIGURE 4

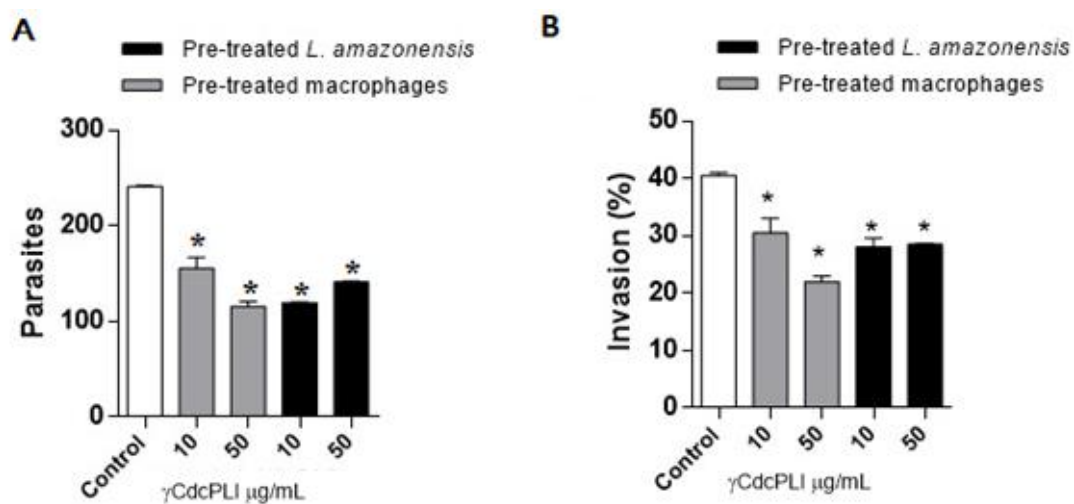


Figure 4: Effect of  $\gamma$ CdcPLI on the invasive capacity of *L.(L.) amazonensis* promastigotes in macrophages C57. (A) Total number of intracellular parasites. (B) Percentage of invaded cells in a total of 200 cells examined randomly. (n=3). \*Statistically significant difference ( $p < 0.05$ ) compared with the control.