



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

**CollinLAAO: uma nova L-aminoácido oxidase com potencial leishmanicida
isolada da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

Aluno: Vitor de Freitas

Orientador: Prof^ª. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Dra. Tássia Rafaella Costa

UBERLÂNDIA-MG

2020



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

**CollinLAAO: uma nova L-aminoácido oxidase com potencial leishmanicida
isolada da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

Aluno: Vitor de Freitas

Orientador: Prof^a. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

Co-Orientador: Dra. Tássia Rafaella Costa

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

UBERLÂNDIA-MG

2020

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

F866c
2020 Freitas, Vitor de, 1994-
CollinLAAO [recurso eletrônico] : uma nova L-aminoácido oxidase
com potencial leishmanicida isolada da peçonha de *Crotalus durissus
collilineatus* / Vitor de Freitas. - 2020.

Orientadora: Veridiana de Melo Rodrigues Ávila.

Coorientadora: Tássia Rafaella Costa.

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.2025.5200>

Inclui bibliografia.

Inclui ilustrações.

1. Bioquímica. I. Ávila, Veridiana de Melo Rodrigues, 1971-,
(Orient.). II. Costa, Tássia Rafaella, 1982-, (Coorient.). III. Universidade
Federal de Uberlândia. Programa de Pós-graduação em Genética e
Bioquímica. IV. Título.

CDU: 577.1

André Carlos Francisco
Bibliotecário-Documentalista - 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 Umuarama, 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 - 07/2020 - PPGGB.				
Data:	Vinte e nove de dezembro de dois mil e vinte	Hora de início:	14:40h	Hora de encerramento:	15:10h
Matrícula do Discente:	11822GBI016				
Nome do Discente:	Vítor de Freitas				
Título do Trabalho:	CollinLAO: uma nova L-aminoácido oxidase com potencial leishmanicida isolada da peçonha de <i>Crotalus durissus collilineatus</i> .				
Área de concentração:	Bioquímica				
Linha de pesquisa:	Estrutura e Função de Proteínas.				
Projeto de Pesquisa de vinculação:	Ação antiangiogênica e antimetastática de uma fosfolipase A2 de peçonha ofídica em câncer de mama: uma abordagem <i>in vitro</i> , <i>ex vivo</i> e <i>in vivo</i> . MODALIDADE: "EDITAL 001/2017 - DEMANDA UNIVERSAL.				

Aos vinte e nove dias do mês de dezembro de dois mil e vinte, às 14:40 horas, reuniu-se via web conferência pela plataforma Google Meet, 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), Andreimar Martins Soares e Samuel Cota Teixeira. 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 **Samuel Cota Teixeira, Usuário Externo**, em 29/12/2020,



às 16:55, 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 **Andreimar Martins Soares, Usuário Externo**, em 29/12/2020, às 18:07, 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 **Veridiana de Melo Rodrigues Avila, Professor(a) do Magistério Superior**, em 29/12/2020, às 19:06, 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, informando o código verificador **2424399** e o código CRC **0AC9BF5F**.



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

**CollinLAAO: uma nova L-aminoácido oxidase com potencial leishmanicida
isolada da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus***

ALUNO: Vitor de Freitas

COMISSÃO EXAMINADORA

Presidente: Prof^a. Dra. Veridiana de Melo Rodrigues Ávila (Orientadora)

Examinadores: Dr. Samuel Cota Teixeira

Prof. Dr. Andreimar Martins Soares

Data da Defesa: 23/12/2020

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

Veridiana de Melo Rodrigues Ávila

(NOME DA ORIENTADORA)

Dedico este trabalho a meus pais, Claudinei e Elisa, toda minha formação só foi possível graças a vocês e seu apoio incondicional.

Dedico a minha tia Zilza por ser meu exemplo de pessoa estudiosa.

Dedico por último a todas crianças e adolescentes com o sonho de serem cientistas, pois também já foi um.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a minha orientadora pelas inúmeras horas de paciência infinita, por sempre fazer críticas construtivas, sempre acreditar em mim, por me permitir explorar, crescer e por me permitir errar. Seu exemplo de profissionalismo me incentiva diariamente a melhorar. Mas acima de tudo pelo exemplo de humanidade que me ofereceu em momentos difíceis, por me mostrar que mesmo em ambiente profissional compaixão e empatia ainda podem estar presentes. Admiro muito a professora, pesquisadora e orientadora Veridiana, mas acima de tudo, admiro a pessoa que você é.

Agradeço a Tássia pela disponibilidade e por sempre solucionar minhas dúvidas, sobretudo por implementar novas metodologias aos estudos do Laboratório de Bioquímica e Toxinas Animais (Labitox-UFU). Sou grato pelos conselhos profissionais e pessoais. Este trabalho não existiria sem sua presença, e se um dia eu me tornar doutor, você sempre será parte do motivo.

Marina (Marinex), Ana e Pri, sempre no coração, obrigado por tornarem o Labitox um ambiente de risadas, comemorações, obrigado pelos ombros para chorar e pela paciência em ouvir as reclamações. Os dias nunca eram nublados, pois vocês eram raios de sol.

Marina neves, meu *xuxu* do Labitox, minha eterna dupla, carinho sempre te definiu para mim, jamais serei capaz de entender como você conseguiu fazer tudo que fez por mim. Acho que poderia escrever por horas sobre você, sobre nós, “mas mano, tamo junto e é isso”.

Agradeço a Amanda por ser uma incrível parceira de projeto.

Agradeço a meus pais, Claudinei e Elisa, primeiramente sem o apoio financeiro de vocês eu jamais teria chegado aonde cheguei, e sem o apoio emocional, eu não teria aguentado.

A minha tia Zilza, primeiramente obrigado por me ensinar os prazeres da leitura, obrigado pelos inúmeros cinemas, jantares, passeios, caronas etc. A vida sempre foi mais leve contigo por perto.

A minha prima Jéssica, melhor pessoa com quem já morei, companhia para todas as horas, obrigado pela paciência, pelo apoio, pelo encorajamento, mas acima de tudo, obrigado por compartilhar sua sabedoria comigo até os dias atuais.

Agradeço a minha “família” de Uberlândia, Luísa, Joice, Clara e Ingrid. Só dizer que vocês são minha família já deixa claro o quanto amo vocês, obrigado por me carregarem quando minhas pernas não tinham forças, e agora, obrigado por caminharem junto a mim pela longa estrada da vida.

RESUMO

As SV-LAAOs (*Snake Venom L-amino acid oxidases*) são flavoenzimas que catalisam a deaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos em α -cetoácidos liberando amônia e peróxido de hidrogênio como produtos. Essas enzimas são alvos de inúmeras pesquisas devido a seus efeitos biológicos e farmacológicos que incluem efeitos bactericida, antivirais, antitumorais e antiparasitários, atribuídos, principalmente, pela formação do peróxido de hidrogênio. O objetivo deste trabalho foi isolar uma nova L-aminoácido oxidase (LAAO) da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*, caracterizá-la bioquimicamente, bem como avaliar seu potencial leishmanicida sobre diferentes linhagens de *Leishmania spp.* A nova LAAO, denominada CollinLAAO, foi isolada em dois passos cromatográficos em gel de filtração seguida de troca aniônica. Esta apresentou 2,5% da peçonha total, com massa molecular de 63,1kDa por SDS-PAGE. A CollinLAAO foi armazenada em tampão AMBIC 10 mM a 4°C protegida da luz e apresentou atividade de 3000 U/mg/min, com redução de 50% de sua atividade após 21 dias. A CollinLAAO demonstrou maior afinidade pelo aminoácido L-Leucina e melhor atividade enzimática em pH neutro e básico em temperaturas de 0 e 25°C. Sua atividade foi completamente inibida pela catalase, bem como na presença de Na⁺ e K⁺. Os ensaios de citotoxicidade revelaram IC₅₀ de 62,73, 45,05 e 11,66 µg/mL para *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* respectivamente, sua toxicidade foi completamente inibida pela catalase. A CollinLAAO (0,78 µg/mL) aumentou significativamente a concentração intracelular de espécies reativas de oxigênio (EROs) e reduziu o potencial mitocondrial de *Leishmania (L.) amazonensis* (1,56 e 0,78 µg/mL) e *Leishmania (L.) infantum* (1,56; 0,78 e 0,39 µg/mL). CollinLAAO mostrou maior toxicidade para macrófagos RAW 264.7 com uma IC₅₀ de 0,55 µg/mL, bem como diminuiu o índice de infectividade para 26,41% e 31,85% a 0,78µg/mL e 0,39 µg/mL, respectivamente, indicando que concentrações subtóxicas da CollinLAAO são capazes de interferir em processos vitais das leishmanias. Dessa forma, os resultados obtidos para a CollinLAAO fornecem subsídios importantes para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas de ação leishmanicida.

Palavras-chave: Veneno de serpente; *Crotalus durissus collilineatus*; L-aminoácido oxidase; leishmaniose.

ABSTRACT

SV-LAOs (Snake Venom L-amino acid oxidases) are flavoenzymes that catalyse the stereospecific oxidative deamination of L-amino acids into α -keto acids releasing ammonia and hydrogen peroxide as products. These enzymes are the target of numerous researches due to their biological and pharmacological effects that include bactericidal, antiviral, antitumor and antiparasitic effects, attributed mainly to the formation of hydrogen peroxide. The objective of this work was to isolate a new L-amino acid oxidase from the *Crotalus durissus collilineatus* venom, to characterize it biochemically, as well as to evaluate its leishmanicidal potential on different species of *Leishmania spp.* The new LAEO, called CollinLAEO, was isolated by two chromatographic steps on gel filtration followed by anionic exchange. This enzyme represented 2.5% of the whole venom, with a molecular mass of 63.1 kDa by SDS-PAGE. CollinLAEOs was stored in AMIB buffer 10 mM at 4°C protected from light and showed an activity of 3000 U / mg / min, with a 50% reduction after 21 days. CollinLAEO demonstrated higher affinity for the amino acid L-Leucine, and better enzymatic activity at neutral and basic pH at temperatures ranging from 0 to 25 °C. Its activity was completely inhibited by catalase, as well as in the presence of Na⁺ and K⁺. The cytotoxicity tests revealed IC₅₀ of 62.73, 45.05 and 11.66 µg/mL for *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* and *Leishmania (L.) infantum* respectively, the enzyme cytotoxicity was completely inhibited by catalase. CollinLAEO (0.78 µg/mL) significantly increased the intracellular concentration of reactive oxygen species (ROS) and reduced the mitochondrial potential of *Leishmania (L.) amazonensis* (1.56 and 0.78 µg/mL) and *Leishmania (L.) amazonensis* (1.56, 0.78 and 0.39 µg/mL). CollinLAEO showed higher toxicity for RAW 264.7 macrophages with an IC₅₀ of 0.55µg/mL, as well as decreased the infectivity index to 26.41% and 31.85% at 0.78 µg/mL and 0.39 µg/mL, respectively, indicating that subtoxic concentrations of CollinLAEO are capable of interfering in vital processes of leishmanias. Thus, the results obtained for CollinLAEO provide important subsidies for the development of therapeutic strategies with leishmanicidal action.

Keywords: Snake venom; *Crotalus durissus collilineatus*; L-amino acid oxidase; leishmaniasis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Espécime de <i>Crotalus durissus collilineatus</i>	3
Figura 2. Deaminação oxidativa de aminoácidos catalisada por LAAOs	5
Figura 3. Ciclo biológico de <i>Leishmania spp.</i>	11
Figura 4. Estado da endemividade de leishmaniose cutânea no mundo em 2018	14
Figura 5 Cascata de eventos dependente de tripanotiona redutase TR	16
Figura 6. Estrutura química da Tripanotiona e glutathione.....	16
Figura 7. Isolamento da CollinLAAO	30
Figura 8. Cálculo da massa molecular da CollinLAAO	32
Figura 9. Caracterização enzimática da CollinLAAO.....	36
Figura 10. Perfil citotóxico de CollinLAAO sobre diferentes espécies de <i>Leishmania spp.</i>	39
Figura 11. Produção de EROs em <i>Leishmania spp.</i> induzida por CollinLAAO	42
Figura 12. Alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) induzido por CollinLAAO em <i>Leishmania spp.</i>	44
Figura 13. Viabilidade de macrófagos RAW tratados com CollinLAAO	47
Figura 14. Efeito da CollinLAAO sobre a infectividade de <i>L. (L.) infantum</i> em macrófago hospedeiro	48

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Rendimento proteico da CollinLAAO obtida no fracionamento da peçonha bruta de *C. d. collilineatus* em Sephadex G-75 e Capto-DEAE.....31

Tabela 2. Efeito da CollinLAAO sobre a infectividade de *L. (L.) infantum* em macrófago hospedeiro.....46

LISTA DE ABREVIATURAS

C. d.:	<i>Crotalus durissus</i>
EDTA:	Ácido etilenodiamino tetra-acético
ERO:	Espécies reativas de oxigênio
FAD:	Flavina adenina dinucleotídeo
FMN:	Flavina mononucleotídeo
HIV-1:	Vírus da imunodeficiência humana 1
HPLC:	Cromatografia líquida de alta eficiência
IC₅₀:	Concentração requerida para atingir 50% do efeito inibitório máximo
IL-1β:	Interleucina 1 β
IL-6:	Interleucina 6
LAAO:	L-aminoácido oxidases
LC:	Leishmaniose cutânea
LCD:	Leishmaniose cutânea difusa
LCM:	Leishmaniose cutaneomucosa
LIT:	<i>Liver infusion tryptose</i>
LT:	Leishmaniose tegumentar
LV:	Leishmaniose visceral
MTT:	3-(4,5-Dimetil tiazol 2-il)2,5-Difenil Brometo de Tetrazolium
OPD:	O-fenildianisidina
PBS:	Tampão fosfato salino
PMSF:	Fluoreto de fenilmetilsulfonila
RPMI:	Meio de cultura celular (<i>Roswell Park Memorial Institute</i>)
SDS:	Dodecil sulfato de sódio
SDS-PAGE:	Eletroforese em gel de poliacrilamida na presença de SDS
SV-LAAOs:	L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes

SUMÁRIO

1.0 INTRODUÇÃO	1
1.1 Aspectos gerais sobre peçonhas ofídicas	1
1.2 Gênero <i>Crotalus</i> e composição de sua peçonha.....	2
1.3 L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes (SV-LAAOs).....	4
1.4 Efeitos farmacológicos das SV-LAAOs	7
1.5 Leishmaniose humana.....	9
1.6 Bioprospecção.....	17
2.0 OBJETIVOS	19
2.1 Objetivo geral	19
2.2 Objetivos específicos.....	19
3.0 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
3.1 Obtenção da peçonha de <i>C. d. collilineatus</i>	20
3.2 Isolamento da CollinLAAO	20
3.2.1 Cromatografia de Gel Filtração	20
3.2.2 Cromatografia de troca aniônica	20
3.3 Análise de homogeneidade da amostra	21
3.3.1 SDS-PAGE	21
3.3.2 Cromatografia de fase reversa em HPLC	21
3.4 Dosagem proteica	22
3.5 Análise da massa molecular.....	22
3.6 Determinação da atividade LAAO	22
3.7 Caracterização enzimática.....	23
3.7.1 Influência de pH	23
3.7.2 Influência da temperatura.....	23
3.7.3 Influência de íons metálicos.....	24
3.7.4 Atividade sobre diferentes substratos	24
3.7.5 Avaliação da estabilidade da CollinLAAO.....	24
3.8 Cultura de promastigotas e macrófagos	24
3.9 Ensaio de citotoxicidade.....	25
3.10 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)	26
3.11 Avaliação da alteração do dano de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	26
3.12 Ensaio de infectividade.....	27

3.13 Análise Estatística	28
4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO	29
4.1 Isolamento e caracterização bioquímica parcial da CollinLAAO	29
4.2 Caracterização enzimática da CollinLAAO	33
4.3 Avaliação da citotoxicidade da CollinLAAO sobre parasitos do gênero <i>Leishmania spp.</i>	38
4.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular	42
4.5 Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)	44
4.6 Efeitos da CollinLAAO sobre viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 e infectividade parasitária.....	45
5.0 CONCLUSÃO	50
REFERÊNCIAS	51

1.0 INTRODUÇÃO

1.1 Aspectos gerais sobre peçonhas ofídicas

As serpentes constituem o segundo grupo mais diversificado de répteis, com aproximadamente 2.900 espécies de serpentes distribuídas em todo o mundo. No Brasil existem cerca de 405 espécies, distribuídas em 70 gêneros e 10 famílias, sendo que as serpentes peçonhentas de interesse em saúde pública pertencem às Famílias: Viperidae (com representantes nos gêneros *Crotalus*, *Bothrops* e *Lachesis*) e Elapidae, a qual compreende o gênero *Micrurus* (COSTA; BÉRNILS, 2018; BRASIL, 2020^a).

A composição da peçonha pode variar de acordo com a espécie de serpente, idade, época do ano, dieta do animal e localização geográfica. Sua composição se baseia em uma mistura de substâncias, das quais as proteínas correspondem a 90% do peso seco, dentre estas destacam proteínas com atividade enzimática como as metaloproteases, fosfolipases A₂, serinoproteases, hialuronidases, L-aminoácido oxidases (LAOs), acetilcolinesterases; proteínas que não possuem atividade enzimática como lectinas tipo-C, tipo C-like e ativadores de proteína C; peptídeos potencializadores de bradicinina e desintegrinas. Além das proteínas, são encontrados os carboidratos, lipídeos e componentes inorgânicos como K⁺, Mg²⁺, Na⁺, Fe⁺, Mn²⁺ e Zn²⁺ que podem estar associados a algumas proteínas desempenhando função catalítica e estrutural. O envenenamento ofídico apresenta variações intra e inter espécies, seus efeitos fisiopatológicos geralmente incluem: neurotoxicidade, hemotoxicidade, miotoxicidade e citotoxicidade (RAMOS; SELISTRE DE ARAÚJO, 2006; KANG *et al.*, 2011; CASEWELL *et al.*, 2020).

Inicialmente as peçonhas de serpentes foram estudadas com o intuito de conhecer sua natureza bioquímica e as propriedades de seus componentes frente aos efeitos fisiopatológicos observados nos envenenamentos ofídicos. Esses estudos levaram ao isolamento de inúmeras toxinas que foram amplamente caracterizadas estruturalmente, bioquimicamente e biologicamente, que além de fornecerem uma melhor compreensão da fisiopatologia do envenenamento, geraram um crescente interesse em avaliar o potencial terapêutico e farmacológico, com aplicabilidades no tratamento de doenças humanas como hipertensão,

tromboses, câncer e doenças infecciosas (RODRIGUES et al., 2015; CHAN et al., 2016).

1.2 Gênero *Crotalus* e composição de sua peçonha

As serpentes do gênero *Crotalus* são popularmente conhecidas por cascavel, boicina, maracambóia e maracá. São amplamente distribuídas em cerrados, regiões áridas e semiáridas (BRASIL, 2020^a) e possuem uma única representante no Brasil, *Crotalus durissus*, distribuída em seis subespécies: *C. d. collilineatus*, *C. d. terrificus*, *C. d. cascavella*, *C. d. durissus*; *C. d. ruruima* e *C. d. marajoensis*. As serpentes do gênero *Crotalus* são encontradas em campos abertos, áreas secas, arenosas e pedregosas, raramente na faixa litorânea. Não têm hábito de atacar e, quando ameaçadas, denunciam sua presença pelo ruído característico do guizo ou chocalho presente na cauda (PINHO; PEREIRA, 2001; WÜSTER et al., 2005; COSTA; BÉRNILS, 2018).

As serpentes do subgênero *C. d. collilineatus* apresentam faixas longitudinais na região da nuca, com manchas romboides ao longo do corpo possuindo o centro com coloração mais clara que contrasta com o resto do corpo (figura 1) (CAMPBELL; LAMAR; BRODIE, 1989). São distribuídas geograficamente nas regiões secas da região centro-oeste, Minas Gerais e norte de São Paulo. Oliveira e colaboradores (2018) realizaram a análise proteômica de 22 peçonhas de espécimes de *C. d. collilineatus* por RP-FPLC-MS/MS (*reverse phase – fast protein liquid chromatography- mass spectrometry*), sendo 14 de coloração branca, 7 de coloração levemente amarelada e apenas 1 com cor amarelo intenso. Os resultados demonstraram a presença de 15 classes de proteínas, sendo elas: carboxipeptidase, convulxina, crotoxina, crotamina, crotacetina, enzima conversora de angiotensina, fosfodiesterase, fosfolipase A₂, glutational peroxidase, glutaminil ciclotranferase, hialuronidase, metaloprotease, fator de crescimento neural, serinoprotease, peptídeos bioativos e LAAO. Esse estudo revelou a presença de proteínas que não haviam sido reportadas para a espécie até então, demonstrando uma maior complexidade da peçonha do que era esperado.



Figura 1. Espécime de *Crotalus durissus collilineatus* (fonte: GIMENEZ 2013)

A sintomatologia do envenenamento ofídico difere-se quanto ao gênero da serpente devido à variedade de compostos bioativos em suas peçonhas. A peçonha crotálica geralmente induz pouca ou nenhuma lesão local, e possui três atividades com importância clínica descritas: 1) atividade neurotóxica capaz de bloquear as junções neuromusculares com consequente quadro de paralisia respiratória; 2) distúrbios de coagulação por consumo de fibrinogênio; 3) atividade miotóxica sistêmica, causando rabdomiólise podendo levar a insuficiência renal (PINHO; FERREIRA, 2001; AZEVEDO-MARQUES et al., 2009; BRASIL 2020^a).

A peçonha crotálica, assim como de outras serpentes, pode apresentar duas colorações diferentes, branca ou amarela (SCHENBERG, 1959). A coloração amarela é atribuída às flavinas presentes nas LAAOs e, portanto, pode ser um indicador da presença dessas enzimas (TU, 1982). Oliveira e colaboradores (2018) analisaram peçonha de 22 espécimes *C. d. collilineatus* e constataram que a peçonha de coloração amarelo mais intenso apresenta banda eletroforética entre 45 e 66 kDa, indicativo da presença de LAAOs, diferentemente das peçonhas de coloração branca analisadas. A variação branca de peçonha de *C. d. ruruima* apresentou atividade edematogênica, já sua variação amarela além dessa atividade também induziu necrose, sugerindo que existem diferenças na composição molecular entre as variações de cores além da presença de LAAOs (DOS SANTOS; FORTES-DIAS; DOS SANTOS, 2016). Em outras espécies também foram analisadas diferenças por exemplo na peçonha de *Vipera russelli* (DIMITROV; KANKOKAR, 1968) e de *Vipera ammodytes* (KORNALIK; MASTER, 1964), foram detectadas LAAOs em sua variante branca, porém em menores quantidades que nas amarelas.

Durante a captura da presa, as serpentes se expõem a uma variedade de microrganismos que podem ser carregados do ambiente que as rodeia, a peçonha então apresenta um papel protetor frente aos potenciais agentes nocivos (MACKESSY, 2010). As LAAOs apresentam atividade antimicrobiana (IZIDORO et al., 2014), portanto a existência dessas enzimas está relacionada com a proteção natural das serpentes contra microrganismos (ANDE et al., 2008).

1.3 L-aminoácido oxidases de peçonha de serpentes (SV-LAAOs)

As LAAOs (EC 1.4.3.2) são amplamente encontradas em diversas espécies, incluindo insetos, fungos, bactérias e serpentes das famílias Viperidae, e Elapidae. Em plantas e bactérias, a amônia, um de seus produtos, é utilizada como fonte de nitrogênio no metabolismo celular (DU; CLEMETSON, 2002; NISHIZAWA et al., 2005; NUUTINEN; TIMONEN, 2008, COSTA et al., 2014).

As LAAOs são flavoproteínas glicosiladas com estrutura dimérica na qual cada subunidade faz uma ligação não covalente com a flavina mononucleotídeo (FMN) ou, como na maioria das LAAOs encontradas em peçonha de serpentes, com a flavina adenina dinucleotídeo (FAD) (COSTA et al., 2014). As LAAOs são, portanto, classificadas como oxirredutases FAD-dependentes e possuem atividade de deaminação oxidativa estereoespecífica de L-aminoácidos gerando como produtos α -cetoácidos, peróxido de hidrogênio (H_2O_2) e amônia (BREGGE-SILVA et al., 2012). O mecanismo de catálise se inicia com reação redutora convertendo FAD em $FADH_2$ paralelo a oxidação do aminoácido em iminoácido, que por sua vez sofre hidrólise não enzimática liberando α -cetoácido e amônia. Outra reação oxidativa acontece para finalizar o ciclo, reoxidando $FADH_2$ com o oxigênio molecular produzindo peróxido de hidrogênio (figura 2) (COSTA et al., 2014).

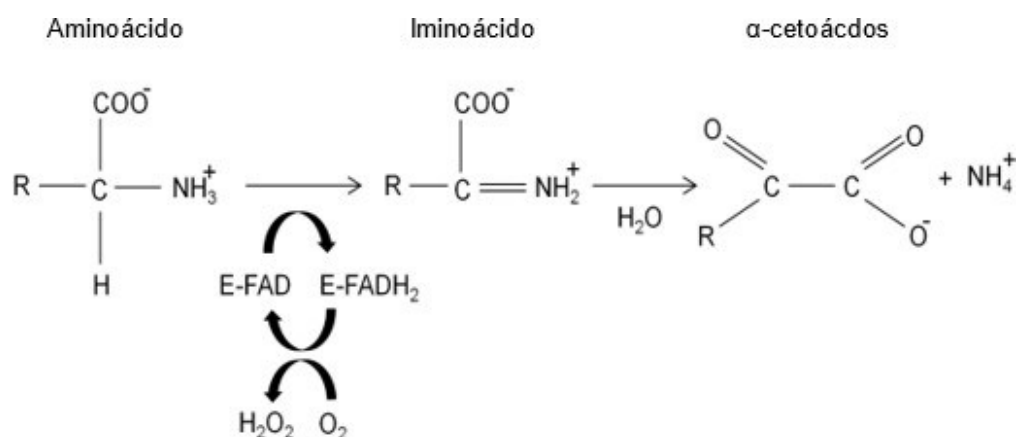


Figura 2. Deaminação oxidativa de aminoácidos catalisada por LAAOs. (fonte: COSTA et al., 2014)

As SV-LAAOs possuem massa entre 110 e 150 kDa em sua forma nativa (homodimérica) determinada por filtração molecular, porém quando tratadas sob condições desnaturantes, a massa molecular de cada monômero determinada tanto por SDS-PAGE ou por espectrometria de massa é de aproximadamente 50 a 70 kDa (DU; CLEMETSON, 2002; IZIDORO, 2014). Além disso, podem ser ácidas ou básicas, com ponto isoelétrico (PI) variando entre 4,4 e 8,5, sendo que, ambas as formas podem coexistir na mesma peçonha e podem apresentar propriedades farmacológicas distintas (STILES, 1991; CURTI et al., 1992; AHN et al., 1997; DU; CLEMETSON, 2002). Os dímeros funcionais das SV-LAAOs consistem em um domínio de ligação ao FAD, um domínio de ligação ao substrato e um domínio helicoidal envolvido na dimerização da proteína (ZHANG et al., 2004; MOUSTAFA et al., 2006).

A atividade enzimática de SV-LAAOs isoladas é determinada por um ensaio utilizando peroxidase de rabanete, assim o peróxido de hidrogênio gerado pela LAAO é consumido pela peroxidase para oxidar o-fenildianisidina (OPD) a um radical catiônico que pode ser monitorado a 490 nm. Para tal ensaio a L-Leucina é o substrato comumente utilizado, visto que as SV-LAAOs possuem alta afinidade por aminoácidos hidrofóbicos como L-Fenilalanina, L- Triptofano, L-Metionina e L-Leucina (DU; CLEMETSON, 2002).

As LAAOs exibem absorbância típica entre 490 e 380 nm devido a presença do FAD (MASSEY; CURTI, 1967) e são inativadas durante congelamento ou por alterações do pH do meio, tais eventos podem ser observados pela mudança na absorbância das amostras, o que indicia alterações no microambiente do cofator FAD, portanto, as SV-LAAOs devem ser armazenadas a 4 °C em pH neutro (DU; CLEMETSON, 2002).

Mackessy (1985) fracionou a peçonha de *Crotalus ruber ruber* obtendo entre outras toxinas, uma LAAO, que por sua vez teve sua atividade inibida na presença de EDTA, N-etilmaleimida, 1,10-fenantrolina, PMSF e glutatona. Na presença de tais inibidores o cofator FAD é reduzido inativando a enzima (MANNERVICK, et al., 1980). Diferentes íons bivalentes podem ativar ou inibir algumas LAAOs. A LAAO de *Crotalus adamanteus* requer Mg^{2+} para seu funcionamento (PAIK; KIM, 1965), enquanto as de *Lachesis muta* e *Bothrops brazili* são inibidas pela presença de Zn^{2+} (CISNEROS, 1996; SOLIS, et al., 1999). A ação inibitória desses íons pode estar relacionada com sua habilidade de se ligar reversivelmente aos grupos tióis de cisteína presentes no sítio ativo da enzima, reduzindo sua atividade (IZIDORO et al., 2014).

As SV-LAAOs são glicoproteínas e possuem porcentagem variável de açúcar de acordo com a espécie de serpente (IZIDORO et al., 2014). Carboidratos como a fucose, manose, galactose, N-acetilglucosamina e ácido siálico já foram identificados em suas estruturas (KOK; RAWITCH, 1969, ALI et al., 1999). Esses carboidratos são ligados à enzima por ligações N-glicosídicas e podem alterar suas propriedades físico-químicas, aumentar a solubilidade e viscosidade da proteína, e mantêm a estabilidade das cargas elétricas (IZIDORO et al., 2014).

Em geral, as SV-LAAOs possuem sítios de glicosilação bem conservados nos aminoácidos Asn172 e Asn361. A porção glicana das SV-LAAO se encontra geralmente próxima a entrada do oxigênio e da saída de peróxido de hidrogênio e tem sido relacionada com um aumento da concentração de peróxido mediante ao ancoramento na superfície celular. Assim sendo, a porção glicana possui um importante papel em sua atividade biológica (ULLAH, 2020).

1.4 Efeitos farmacológicos das SV-LAOs

As SV-LAOs apresentam inúmeros efeitos farmacológicos, como indução de apoptose celular (COSTA et al., 2017), indução e inibição de agregação plaquetária (NATHAN, et al., 1982; NAUMANN et al., 2011), hemorragia (STABÉLI et al., 2004), edema (STÁBELI et al., 2007), atividades bactericida (COSTA et al., 2015) e antiparasitária (RODRIGUES et al., 2009), entretanto, os mecanismos pelos quais essas enzimas exercem suas atividades não estão totalmente elucidados. Acredita-se que os efeitos farmacológicos destas enzimas sejam atribuídos ao peróxido de hidrogênio gerado durante a reação enzimática, pois na presença de catalase, um agente que degrada H_2O_2 , o efeito das LAOs é geralmente inibido (DU; CLEMETSON, 2002).

O efeito hemorrágico das SV-LAOs se dá pela apoptose de células do endotélio vascular, que culmina no extravasamento do sangue, no entanto poucas são as LAOs isoladas que apresentam tal atividade (IZIDORO et al., 2014). Devido ao extravasamento de sangue, as SV-LAOs também são tidas como edematogênicas, embora essa atividade não esteja relacionada ao recrutamento de outros mediadores de inflamação, como acontece com toxinas de serpentes de outras classes. Ali e colaboradores, (1999) demonstraram que a atividade edematogênica da enzima não era inibida com dexametasona, um poderoso anti-inflamatório, entretanto, a atividade foi completamente inibida pelo tratamento com glutathione, indicando que a indução do edema está relacionada com a produção de peróxido.

As SV-LAOs também possuem potencial de induzir agregação plaquetária. Novamente o peróxido de hidrogênio possui papel fundamental, podendo interagir com receptores de agregação (GPIIb/IIIa) e fibrinogênio (DU; CLEMETSON, 2002; ZHONG et al., 2009), mas seu mecanismo de ação sobre a função plaquetária requer mais estudos.

Os estudos envolvendo a atividade citotóxica das SV-LAOs sobre tumores vêm crescendo (SANTOS et al., 2008; COSTA et al., 2017; ABIDIN et al., 2018; SALAMA et al., 2018). Sabe-se que estas podem causar citotoxicidade por dois processos: necrose e apoptose, sendo o primeiro relacionado a ação direta da enzima ou de seus produtos catabólicos na membrana da célula, promovendo sua

degeneração (SUHARA et al., 1998; ZHANG; WEI, 2007; ANDE et al., 2008). O mecanismo das LAAOs na indução de apoptose ainda não é completamente elucidado, mas pode ser parcialmente explicado pela produção de peróxido de hidrogênio que se acumula na superfície da membrana celular, promovendo desarranjo mitocondrial, induzindo atraso no crescimento e causando a morte da célula (DU; CLEMETSON, 2002). Diversos estudos avaliaram os efeitos citotóxicos das LAAOs na presença de catalase e foi possível observar redução significativa ou anulação de sua citotoxicidade (DU; CLEMETSON, 2002; IZIDORO et al., 2014). As caspases são proteases intracelulares da família das cisteínas e são sinalizadoras de apoptose (DU et al., 2000). DiPietrantonio e colaboradores (1999) detectaram um aumento na atividade da Caspase 3 em células HL-60 (leucemia humana) tratadas com peróxido de hidrogênio.

Costa e colaboradores (2017) demonstraram que a LAAO isolada de *Calloselasma rhodostoma* (CR-LAAO) promoveu apoptose em células HL-60 e HepG2 (câncer de fígado humano) através da produção de peróxido de hidrogênio e ativação de células do sistema imunológico, resultando em estresse oxidativo e produção de IL-6 e IL-1 β que ativaram uma série de eventos incluindo a expressão do gene pro-apoptótico BAX. A CP-LAAO, isolada de *Cryptelytrops purpureomaculatus*, demonstrou efeitos citotóxicos em duas linhagens de células humanas de câncer de cólon SW480 e SW620, de maneira dose dependente com IC₅₀ de 13 μ g/mL para ambas as linhagens. Os resultados mostraram alterações morfológicas indicativas de apoptose (ABIDIN et al., 2018).

No que diz respeito ao potencial microbicida das SV-LAAOs, desde que Skarnes (1970) observou pela primeira vez o efeito bactericida de uma LAAO isolada de *Crotalus adamanteus*, muitas outras SV-LAAOs demonstraram ser efetivas contra bactérias, independente do gênero da serpente, como: *Trimeresurus jerdonni* (LU et al., 2002), *Bothrops alternatus* (STÁBELI et al., 2004), *Crotalus durissus cascavella* (TOYAMA et al., 2006), *Vipera labetina* (TÕNISMÄGI et al., 2006), *Naja naja oxiana* (SAMEL et al., 2008), *Daboia ruselli siamensis* (ZHONG et al., 2009). O mecanismo de ação das SV-LAAOs sobre bactérias ainda não é completamente elucidado, mas novamente relaciona-se com a toxicidade causada pelo peróxido de hidrogênio produzido, o qual pode causar

lipoperoxidação da parede bacteriana (EHARA et al., 2002) e dano ao DNA (ZHANG; WEI, 2007), com consequente morte celular.

A SV-LAAO isolada de *Crotalus durissus cascavella* apresentou atividade bactericida contra *Xanthomonas axonopodis* pv. *passiflorae* (Gram-negativa) e *Streptococcus mutans* (Gram-positiva). O estudo foi conduzido utilizando microscopia eletrônica e demonstrou a ruptura da membrana plasmática dos microrganismos e o consequente extravasamento do conteúdo citoplasmático, levando a morte celular (TOYAMA et al., 2006). De acordo com a literatura, a atividade bactericida de SV-LAAOs deve se relacionar com a produção de EROs causado pelo peróxido de hidrogênio, desencadeando uma desorganização da membrana e do citoplasma com consequente morte celular (IZIDORO et al., 2014).

Os efeitos antivirais das SV-LAAOs também já foram relatados, porém ainda necessitam de mais estudos. Uma LAAO isolada da peçonha de *Trimeresurus stejnegeri* denominada TSVLAO reduziu a replicação do HIV-1 através da redução da produção da proteína p24, entretanto a enzima não foi capaz de impedir a entrada do vírus em células hospedeiras, sugerindo que não é capaz de bloquear a fusão e/ou adsorção do vírus (ZHANG et al., 2003). Outra SV-LAAO, isolada da peçonha de *Bothrops jararaca* demonstrou redução da carga viral do DENV-3 (vírus da dengue) de linhagem de células C6/36 (células de larva do *Aedes albopictus*) infectadas e tratadas com a toxina em relação ao grupo controle (SANT'ANA et al., 2008).

O potencial antiparasitário das SV-LAAOs tem um enfoque quanto à sua ação leishmanicida e tripanomicida (BREGGE-SILVA et al., 2012; COSTA et al., 2015; SOARES et al., 2020). Ainda não há muitos dados sobre o mecanismo de ação das SV-LAAOs sobre leishmanias, entretanto, inúmeras pesquisas demonstram a inibição da atividade quando na presença de catalase ou glutathione, o que indica a relação do peróxido de hidrogênio produzido com tal atividade (IZIDORO et al., 2014).

1.5 Leishmaniose humana

A leishmaniose é uma doença endêmica tropical, popularmente conhecida como úlcera de Bauru ou Calazar, podendo afetar o homem e o cão. Esta é causada

por protozoários flagelados do gênero *Leishmania* e transmitida ao homem pela picada de mosquitos flebotomíneos do gênero *Lutzomyia* (chamados de "mosquito palha" ou birigui). Sua manifestação pode ser através de ulcerações cutâneas ou infecções viscerais e poucos fármacos estão disponíveis para o tratamento da leishmaniose, devido à alta toxicidade (GONTIJO; MELO, 2004; NAGLE et al., 2014).

Os organismos do gênero *Leishmania* são protozoários unicelulares digenéticos, apresentando diferentes formas adaptativas (amastigotas; promastigotas procíclicas e promastigotas metacíclicas) durante seu ciclo de vida (BESTEIRO et al., 2007; NEVES, 2016).

As formas amastigotas apresentam-se tipicamente ovoides ou esféricas, não possuem flagelo livre, apenas um rudimento que está presente na bolsa flagelar, uma pequena invaginação na superfície do parasito (NEVES, 2016). Esta forma infecta células do sistema fagocitário mononuclear do hospedeiro vertebrado e apresenta importantes modificações para garantir sua sobrevivência como tamanho reduzido, flagelo internalizado e capacidade de sobrevivência em ambientes com baixo pH (BESTEIRO et al., 2007; NEVES, 2016).

As formas promastigotas são alongadas e apresentam um flagelo livre em sua região anterior, possuem um tamanho variável mesmo para membros da mesma espécie (NEVES, 2016). As formas promastigotas se subdividem em duas outras formas, promastigotas procíclicas e promastigotas metacíclicas. As formas promastigotas procíclicas são encontradas no intestino médio do inseto vetor, possuem um corpo mais arredondado e um flagelo pequeno, além disso, se multiplicam rapidamente. As formas metacíclicas possuem um corpo menor e mais alongado, seu flagelo pode medir até duas vezes seu comprimento. Quando a forma promastigota metacíclica completa seu desenvolvimento, adquire capacidade infectiva e então migra para a probóscide do vetor (GOSSAGE et al., 2003).

O desenvolvimento biológico das leishmanias em hospedeiros mamíferos é relativamente simples. Promastigotas metacíclicas são introduzidas no hospedeiro mamífero através da picada de fêmeas flebotomíneas durante seu processo de alimentação. Essas formas são rapidamente fagocitadas pelos macrófagos então as formas promastigotas metacíclicas se diferenciam em amastigotas e iniciam seu

processo de multiplicação (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; GOSSAGE et al., 2003).

Durante o repasto sanguíneo de uma fêmea flebotomínea podem ser ingeridas formas amastigotas livres no sangue ou de tecido, além de macrófagos infectados. Dentro do inseto vetor o desenvolvimento e maturação dos parasitos se diferencia em grau de subgênero. Os organismos pertencentes ao subgênero *Leishmania* se multiplicam e desenvolvem exclusivamente na região média do estômago. Já os membros do subgênero *Viannia* dirigem-se para o intestino posterior se estabelecendo nas regiões do piloro e íleo, onde permanecem aderidas através de hemidesmossomas e continuam sua divisão. Ambos os subgêneros completam seu processo de maturação no trato gastrointestinal, assim sendo se tornam promastigostas metacíclicas, que migram para a probóscide do inseto, onde podem infectar outro hospedeiro mamífero durante a alimentação do vetor (figura 3) (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002; NEVES, 2016).

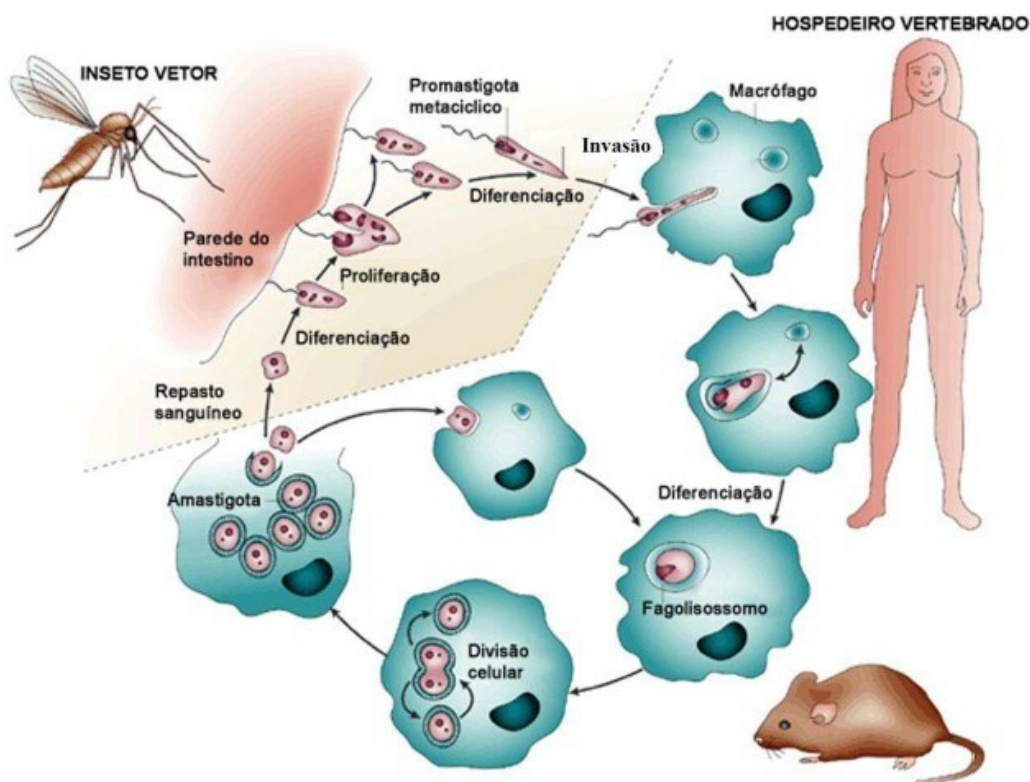


Figura 3. Ciclo Biológico de *Leishmania* spp. As Leishmanias são transmitidas através da picada de fêmeas flebotomíneas do gênero *Lutzomyia*, a qual injeta formas promastigotas metacíclicas no

tecido dérmico do hospedeiro vertebrado. Essas formas são rapidamente opsonizadas pelos macrófagos e residem dentro dos fagolisossomos, se replicando e transformando em amastigotas. Macrófagos infectados ingeridos pelos flebotomíneos durante a alimentação. No intestino médio, ocorre a lise dos macrófagos e a liberação dos parasitos, que rapidamente se dividem e transformam em promastigotas não infectivos. Essas formas passam por um processo de adesão às paredes do trato gastrointestinal e se tornam promastigotas metacíclicas (forma infectiva), então migram para a probóscide do inseto e podem ser transmitidas a outro hospedeiro. Adaptado. (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002).

As leishmanioses representam um grupo de doenças causadas por mais de 21 espécies de leishmanias, as quais causam distintos quadros clínicos que podem variar desde lesões cutâneas de cura espontânea até a comprometimentos sistêmicos mais graves e potencialmente fatais (BURZA et al., 2018; WHO, 2020). Genericamente o grupo é dividido em duas formas principais da doença: leishmaniose visceral e leishmaniose tegumentar.

A leishmaniose visceral (LV), também conhecida como calazar ou kala-azar apresenta um quadro clínico padrão de febre irregular e persistente, acompanhada de esplenomegalia, entretanto pancitopenia, hepatomegalia, hipergamaglobulinemia e perda de peso também são sintomas comuns (HARHAY et al., 2011; BURZA et al., 2018; WHO, 2020). É potencialmente mais grave que a forma cutânea, acometendo o sistema linfo-monocitário e pode ter uma evolução fatal quando não tratada (GONTIJO; MELO, 2004). Na África e na Ásia essa forma é causada por *L. (L.) donovani*, já no Oriente Médio, Mediterrâneo, Ásia central e Américas do Sul e Central é causada por *L. (L.) infantum* (BURZA et al., 2018).

A leishmaniose dérmica post-kala-azar (PKDL) é uma dermatose resultante da complicação de leishmaniose visceral que acomete pacientes tidos como recuperados. É caracterizada por uma erupção macular, maculopapular e nodular hipopigmentada, que geralmente se inicia pela região bucal e se espalha para o restante do corpo, dependendo da severidade do caso. Os sintomas aparecem, na maioria dos casos, dentro de 6 meses a 1 ano após a aparente cura de LV, entretanto podem aparecer antes e até mesmo concomitante com a LV. Sua prevalência se dá principalmente na Índia e no Sudão, onde ocorrem em 5 a 10% e 50% respectivamente, dos acometidos por LV, no entanto a PKDL está associada somente ao agente *L. (L.) donovani* e exerce um papel fundamental na manutenção

e transmissão da doença, uma vez que os infectados atuam como reservatórios para os parasitos (ZIJLSTRA et al., 2003; WHO, 2020).

A leishmaniose tegumentar (LT) é a forma mais comum da doença e não apresenta letalidade nem transmissão por contato direto com as feridas, portanto, é considerada a forma menos grave da doença. Embora não seja letal, é uma doença que leva morbidade estética e estigmatização social, pois é caracterizada pela aparição de feridas que podem ulcerar deixando uma cicatriz permanente quando se curam. Em casos mais graves pode gerar considerável desfiguração da mucosa facial, como boca e nariz. (BASANO; CAMARGO, 2004; BURZA et al., 2018; WHO, 2020). A LT pode se manifestar de três formas clínicas diferentes, que dependem da espécie de parasito, da resposta imunológica do hospedeiro e condições ambientais, sendo que a mesma espécie pode causar quadros sintomáticos diferentes (SKRABA et al., 2014).

A leishmaniose cutânea (LC) é caracterizada por lesões indolores na pele, geralmente em partes expostas do corpo, como rosto, braços e pernas, que iniciam seus desenvolvimentos como pápulas que então aumentam para um nódulo e culminam em ulceração com o passar dos meses. No Brasil os principais agentes causadores de LC são *L. (V.) braziliensis*, *L. (V.) guyanensis*, *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) lainsoni* (NEVES, 2016; BRASIL, 2020^b; WHO, 2020).

A leishmaniose cutaneomucosa (LCM) geralmente resulta da evolução da LC, principalmente em pacientes não tratados (NEVES, 2016). Essa forma da doença se caracteriza pelo comprometimento parcial ou total da mucosa do nariz, boca e garganta, promovendo destruição tecidual progressiva da cartilagem e leva ao aparecimento de lesões desfigurantes (AMATO, et al., 2003. PALMEIRO et al., 2012). No Brasil a espécie mais comumente associada a LCM é *L. (V.) braziliensis*, e de forma menos comum *L. (V.) guyanensis* (NEVES, 2016).

A última forma clínica da LT é considerada mais rara e apresenta um quadro mais grave que as outras, além de ser mais resistente a tratamentos. A denominada leishmaniose cutânea difusa (LCD) é caracterizada por lesões difusas, formando nódulos não ulcerados na pele que podem atingir o corpo todo (NEVES 2016; BURZA et al., 2018). No Brasil a LCD é relacionada com a espécie *L. (L.) amazonensis*, cerca de 40% dos pacientes infectados desenvolvem a forma

cutânea difusa. Isso ocorre quando o parasito chega ao sistema linfático e dissemina-se a para outras partes do corpo (NEVES, 2016).

Dentre as doenças tropicais negligenciadas, a leishmaniose se encontra entre as sete prioridades da Organização Mundial da Saúde (OMS), sendo a segunda que mais causa mortes. Estima-se que aconteçam cerca de 1,3 milhões de novos casos anualmente (BERN et al., 2008; WHO, 2020). Em 2017, 20.297 dos 22.145 (94%) novos casos reportados a OMS ocorreram em sete países: Brasil, Etiópia, Índia, Quênia, Somália, Sudão e Sudão do Sul (WHO, 2020). As leishmanioses afetam principalmente a América, África, Ásia e Europa e são consideradas endêmicas em 98 países (figura 4) (WHO, 2020).

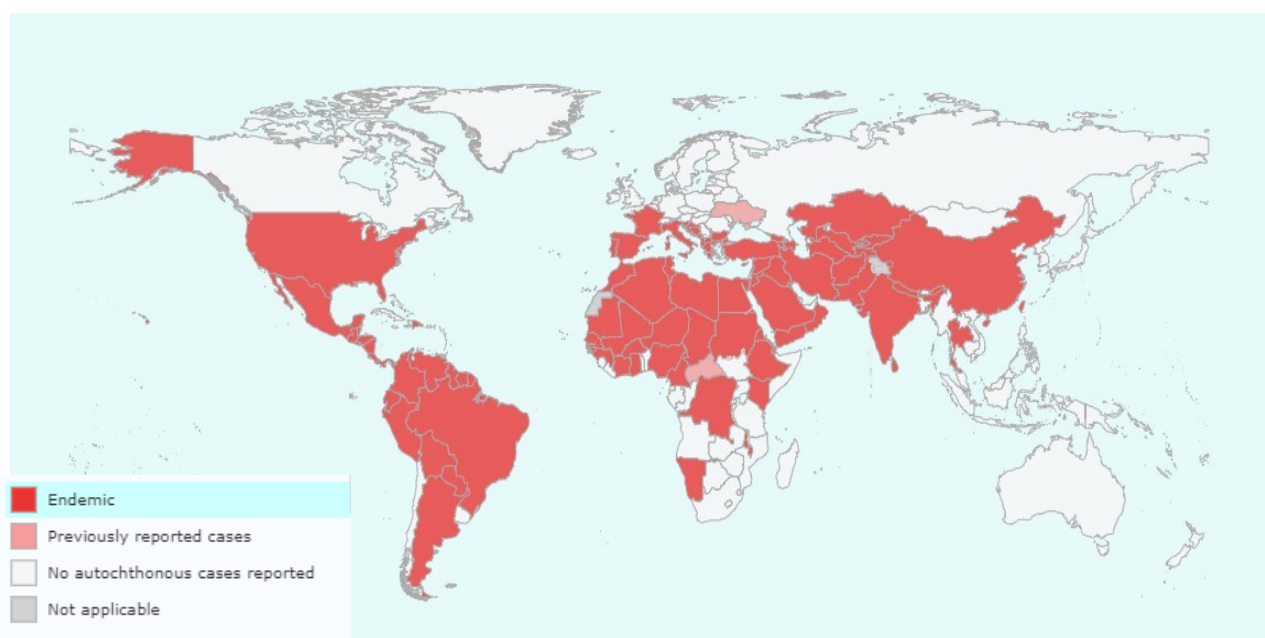


Figura 4. Estado da endemidade de leishmaniose cutânea no mundo em 2018 (adaptado de WHO, 2020)

Nas Américas, 12 países são acometidos pelas leishmanioses e o Brasil registra 90% dos casos do continente. Recentemente observou-se uma mudança no padrão de transmissão, inicialmente predominando em zonas rurais e silvestres e mais recentemente em centros urbanos. Em 2018 no Brasil, foram registrados 16.432 casos de leishmaniose cutânea e 3.466 de leishmaniose visceral, sendo a predominância de ambas as formas ocorrendo nas regiões norte e nordeste do país. Além disso, a leishmaniose visceral apresentou um aumento gradativo da letalidade, passando de 3,1% em 2000 para 7,1% em 2012 (BRASIL, 2020^a).

Os medicamentos de escolha preconizados pela OMS para o tratamento da leishmaniose são: antimoniais pentavalentes, pentamidinas, anfotericina B, paramomicina e miltefosina. No entanto, esses tratamentos oferecem desafios ao paciente por apresentarem alta toxicidade, diversos efeitos colaterais e um custo relativamente alto, além de não serem raros os casos de reincidência pós-tratamento, o que evidencia que a cura da doença não está necessariamente atrelada à eliminação completa dos parasitos, agravando o problema de saúde, já que tais pacientes funcionam como reservatório da doença (WHO, 2010; SILVA et al., 2015).

Embora amplamente utilizados, os mecanismos de ação dos antimoniais ainda não estão completamente elucidados, algumas teorias apontam sua ação para inibição da enzima tripanotona redutase, a qual é responsável por manter o balanço redox e proteger o parasito de espécies reativas de oxigênio (EROs), outros achados indicam a interferência das drogas em enzimas do sistema de reparo de DNA, prejudicando sua capacidade de replicação. Uma última proposta indica uma possível influência da droga sob células fagocitárias hospedeiras, induzindo a produção de EROs e prejudicando a sobrevivência do parasito (FERREIRA et al, 2003; HALDAR; SEN; ROY, 2011).

A busca por novos tratamentos contra leishmanioses segue principalmente em três abordagens: 1) A busca por compostos naturais com potencial leishmanicida, sendo essa a considerada mais promissora; 2) O reposicionamento dos atuais fármacos no mercado, bem como sua complexação com outras moléculas, afim de melhorar sua biodisponibilidade plasmática, seu endereçamento ao alvo e diminuição de efeitos colaterais; 3) exploração de vias metabólicas do parasito para identificação de alvos moleculares e a utilização de compostos que atuem de forma específica (TIUMAN et al., 2011).

Nesse contexto, a busca por alvos moleculares de vias específicas dos parasitos, chama a atenção o sistema redox presente nos tripanossomatídeos. Na maioria dos organismos o controle de EROs é realizado pelos sistemas Glutathiona (GSH)/glutathiona redutase (GR) e tioredoxina(Trx)/tioredoxina redutase(TrxR). Os tripanossomatídeos, porém, possuem um metabolismo de oxirredução baseado na tripanotona ($T[SH]_2$) [N^1 - N^8 -bis(glutathionil)espermidina], juntamente com

tripanotiona redutase (TR), triparedoxina (TXN), triparedoxina peroxidase (TXNPx), nicotinamida adenina dinucleótido fosfato (NADPH) (figura 5) (BEIG et al., 2013).

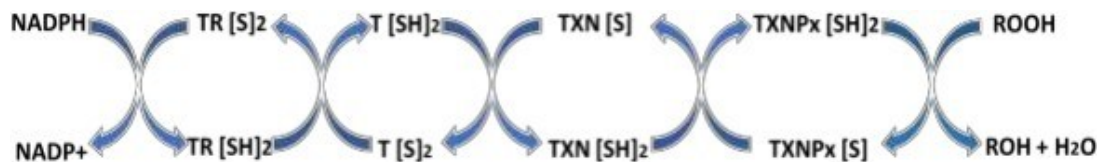


Figura 5 Cascata de eventos dependente de tripanotiona redutase TR, responsáveis pela neutralização das espécies reativas de oxigênio em tripanossomatídeos. NADPH: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato reduzida. NADP+: Nicotinamida adenina dinucleótido fosfato oxidada. TR[SH]₂: Tripanotiona redutase reduzida. TR[S]₂: Tripanotiona redutase oxidada. T[SH]₂: Tripanotiona reduzida. T[S]₂: Tripanotiona Oxidada. TXN[SH]₂: Triparedoxina reduzida. TXN[S]: Triparedoxina oxidada. TXNPx[SH]₂: Triparedoxina peroxidase reduzida. TXNPx[S]₂: Triparedoxina peroxidase oxidada. ROOH: Radical peróxido. ROH+H₂O: Radical hidroxil + Água. (Adaptado de Colotti et al., 2013).

A biossíntese da tripanotiona possui como precursor o tripeptídeo glutationa e a poliamina espermidina, tendo como produto a união de duas GSH unidas pela espermidina (figura 6) (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008). Embora a GR e a TR compartilhem 40% de identidade, existem características estruturais que proporcionam diferentes especificidades de ligação ao substrato. A TR possui capacidade de acomodar substratos constituídos por grupos com maior volume, apresentando um sítio ativo carregado negativamente e regiões hidrofóbicas interagindo com seu substrato mediante interações de *Van der Waals*, já a GR apresenta resíduos carregados positivamente e interage com seu substrato de menor tamanho por interações eletrostáticas (COMINI; FLOHÉ, 2013).

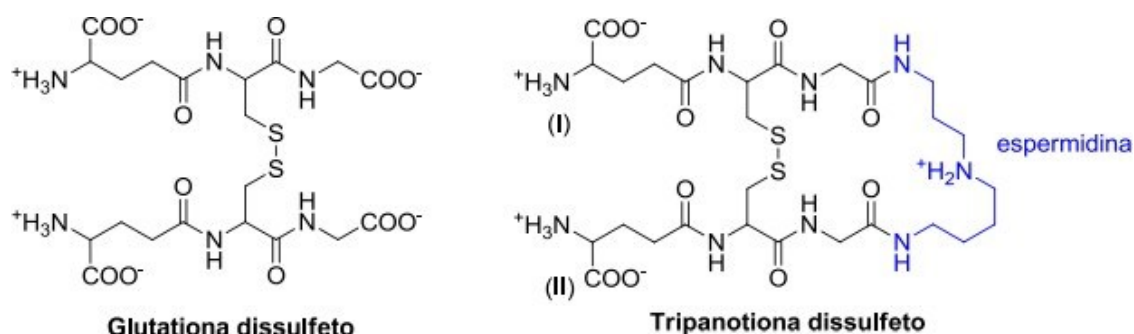


Figura 6. Estrutura química da Tripanotiona e glutathiona. Adaptado de (KRAUTH-SIEGEL; COMINI, 2008).

A enzima TXPNx é capaz de reduzir peróxido de hidrogênio e outros peróxidos em uma taxa razoável, porém glutathiona peroxidase reage 10-100 vezes mais rápido. Essa taxa relativamente baixa de atividade pode ser compensada por altas concentrações da enzima nas células. A ausência da tripanotiona em mamíferos e a sensibilidade dos tripanossomatídeos ao estresse oxidativo torna atrativa a utilização dessas moléculas como alvos moleculares para novos fármacos (KRAUTH-SIEGEL; SCHMIDT, 2002).

Devido ao complexo panorama que envolve doenças negligenciadas, a biodiversidade surge como uma fonte de moléculas de alta variabilidade estrutural, química e de elevado potencial de aplicação biotecnológica e farmacológica.

1.6 Bioprospecção

Os produtos naturais, desde plantas, animais até microrganismos têm inspirado a ciência por milênios, historicamente, eram a fonte de toda preparação medicinal. Avanços na compreensão da biossíntese de produtos naturais, juntamente com novas metodologias de isolamento e caracterização química abriram caminhos para a busca crescente de investigações científicas que visam a compreensão de seus mecanismos de ação (CLARDY; WALSH, 2004).

Os produtos naturais representam a maior fonte de inovações de agentes terapêuticos para doenças infecciosas, câncer, dislipidemias e imunomodulação (CLARDY; WALSH, 2004; HARVEY et al., 2015).

No âmbito da bioprospecção, venenos e peçonhas animais têm sido extensivamente investigados por diversos pesquisadores no mundo todo. Esses

venenos, por serem uma complexa mistura de compostos e apresentarem alta especificidade por seus alvos moleculares, podem ser bons alvos para o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas (ZAMBELLI et al., 2016).

As LAAOs de peçonhas de serpentes compartilham um alto grau de identidade, sugerindo que LAAOs de outras peçonhas também podem apresentar atividade leishmanicida (FRANÇA et al., 2007). O processo catalítico das LAAOs gera como um dos produtos o peróxido de hidrogênio, que tem o potencial de impactar diversos processos biológicos. Dessa forma estudos que exploram a atividade dessa enzima podem demonstrar o papel de sistemas antioxidantes em diferentes patógenos e dessa forma revelar importantes alvos moleculares para o desenvolvimento de novas terapias. Assim, o presente trabalho teve por objetivo avaliar o potencial leishmanicida de uma nova LAAO isolada da peçonha de *Crotalus durissus collilineatus*.

2.0 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Isolar e caracterizar bioquimicamente uma nova L-aminoácido oxidase da peçonha de *Crotalus durissus colillineatus*, bem como avaliar seu potencial leishmanicida sobre cepas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum*.

2.2 Objetivos específicos

- Isolar uma nova LAAO da peçonha de *C. d. colillineatus* (CollinLAAO) através de cromatografias de filtração molecular e troca iônica;
- Caracterizar a atividade enzimática da CollinLAAO sobre diferentes substratos, em diferentes condições de pH, temperatura, presença de íons metálicos, bem como a avaliação de sua estabilidade enzimática;
- Avaliar a citotoxicidade da CollinLAAO sobre cepas de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* pela metodologia de MTT, na presença e ausência de catalase;
- Avaliar a citotoxicidade da CollinLAAO sobre macrófagos RAW pela metodologia de MTT;
- Verificar a interferência da CollinLAAO no processo de infectividade das cepas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* sobre os macrófagos hospedeiros;
- Avaliar o efeito da CollinLAAO sobre o potencial mitocondrial das cepas de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* pelo ensaio de Rodamina;
- Avaliar a produção de EROs intracelular gerados pelo tratamento com CollinLAAO utilizando a sonda CM-H2DCFDA.

3.0 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Obtenção da peçonha de *C. d. collilineatus*

As peçonhas de *C. d. collilineatus* foram obtidas a partir de espécimes mantidos no Setor de Manutenção de Répteis do Instituto de Biologia da UFU, coordenado pela Profa Dra. Vera Lúcia de Campos Brites. Atualmente este setor foi desativado, mas possuía registro desde 1995 pelo Instituto Brasileiro do Meio Ambiente dos recursos Naturais Renováveis (IBAMA), enquadrando-se na categoria Criadouro Conservacionista da Fauna Silvestre - finalidade científica.

3.2 Isolamento da CollinLAAO

3.2.1 Cromatografia de Gel Filtração

Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *C. d. collilineatus* foram dispersos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,3 M pH 8,0, centrifugados a 1000 xg por 10 minutos à 4°C e o sobrenadante límpido foi retirado e aplicado a coluna Sephadex G-75 (95 cm x 9 mm, altura x diâmetro) previamente equilibrada com AMBIC 0,3 M, pH 8,0. A eluição das proteínas foi realizada com o mesmo tampão de equilíbrio em um fluxo de 15 mL/hora. As frações coletadas (2,5 mL) foram agrupadas de acordo com o perfil cromatográfico e posteriormente testadas quanto à atividade LAAO (item 3.5).

3.2.2 Cromatografia de troca aniônica

A fração ativa de LAAO obtida da coluna de gel filtração (G1; 39,48 mg) foi concentrada e dessalinizada em filtros Amicon Ultra (membrana YM 3.000) para trocar o tampão inicial pelo tampão AMBIC 0,05 M pH 8,0 e posteriormente foram aplicados 20 mg da fração a uma coluna Capto-DEAE (GE HealthCare 5 x 5 mL) previamente equilibrada com o mesmo tampão e acoplada ao sistema AKTA Prime. A eluição se deu com um gradiente linear de AMBIC 0,05 M a 1 M com fluxo de 1 mL/minuto. Frações de 1,0 mL foram recolhidas e testadas quanto à atividade LAAO. A fração ativa (D2) foi concentrada por ultrafiltração (membrana YM 3.000),

lavada com tampão AMBIC 10 mM pH 8,0 armazenada a 4 °C para análises subsequentes.

3.3 Análise de homogeneidade da amostra

A homogeneidade da CollinLAAO foi analisada por SDS-PAGE e cromatografia líquida de alta eficiência de fase reversa (HPLC), como descrito a seguir.

3.3.1 SDS-PAGE

As eletroforeses em géis de poliacrilamida a 12,5 % (m/v) em condições redutoras e na presença de SDS foram realizadas segundo a metodologia descrita por Laemmli (1970), com algumas modificações. O sistema de SDS-PAGE descontínuo consistiu de um gel de empilhamento a 3%, contendo Tris-HCl 0,5 M (pH 6,8) e SDS a 0,1% (m/v), e gel de separação a 12,5% contendo TRIS-HCl 1,0 M pH 8,8 e SDS 0,1% mantendo a relação de bis:acrilamida 0,8:30 (m/m).

Todos os géis foram preparados em sistema de eletroforese Hoefer SE 260 Mighty Small II Mini-Vertical. As amostras foram dispersas em Tris-HCl 0,06 M pH 6,8, azul de bromofenol 0,01% (m/v), glicerol 10% (v/v) e β -mercaptoetanol 5% (v/v). O tampão do eletrodo contendo Tris 0,025 M, Glicina 0,192M e SDS 0,1% (m/v), pH 8,3. Após a corrida os géis foram corados em uma solução de Coomassie Brilliant Blue R-250 0,1% (m/v) em água e metanol 1:1 (v/v) e descorados em uma solução de ácido acético 10% e etanol 40%.

3.3.2 Cromatografia de fase reversa em HPLC

Cerca de 300 μ g de CollinLAAO foram aplicados em uma coluna de HPLC de fase reversa C18 (Phenomenex 125 x 4,5 mm), previamente equilibrada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). A eluição foi realizada em fluxo de 1 mL/minuto, usando um gradiente de concentração linear de 0,1% de TFA (v/v) (A) e 70% de acetonitrila (v/v) (B), como segue: 100% A (5 min), 0-100% B (35 min), 100% B (10 min), 100% A (10 min). A eluição da proteína foi monitorada registrando a absorbância a 280 nm.

3.4 Dosagem proteica

As dosagens de proteínas em soluções foram realizadas utilizando o método estabelecido por Bradford (1976). As amostras foram diluídas em 50 µL de água e adicionadas a 150 µL de reagente de Bradford (100 mg de Coomassie Blue G-250, 50 mL de etanol 95%, 100 mL de ácido fosfórico 85% e água deionizada suficiente para completar 1 litro de solução). As determinações das concentrações de proteínas foram realizadas em triplicata e a absorbância medida a 595 nm. Paralelamente a dosagem de proteínas foi construída uma curva padrão de soro albumina bovina (1 mg/mL), considerando o coeficiente de extinção molar em 280 nm (0,665). A concentração de proteínas em µg/µL foi determinada a partir de cálculos de regressão linear baseados nos valores obtidos na curva padrão.

3.5 Análise da massa molecular

A massa molecular da CollinLAAO foi estimada pela distância de migração relativa (R_f) das bandas do peso molecular padrão e da banda da LAAO em SDS-PAGE 12,5%. Com base nos valores obtidos para as bandas do padrão, o logaritmo do peso molecular de um polipeptídeo desnaturado por SDS e sua distância de migração relativa (R_f) foram plotados em um gráfico, usando o software Excel 2016, gerando a equação $y = mx + b$, onde x é o valor da massa molecular da proteína desconhecida.

Sendo R_f = distância de migração das proteínas/ distância de migração do frente, ambos em relação ao topo do gel de separação (Matsumoto et al., 2019).

3.6 Determinação da atividade LAAO

A atividade da LAAO foi determinada usando o método relatado por Bordon e colaboradores (2015), com modificações. CollinLAAO ou as frações cromatográficas (2 µg) foram incubadas por 30 minutos, à temperatura ambiente, com o-fenilenodiamina 2 mM (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO, EUA), 1 U/mL de peroxidase de rabanete (Sigma- Aldrich), L-Leucina 5 µM (Sigma-Aldrich) em tampão Tris-HCl 1 M pH 7,2. A reação foi interrompida com 500 µL de ácido cítrico a 10% (v/v) e a absorbância foi registrada a 490 nm. Os valores de absorbância

foram usados para calcular a atividade específica do LAAO em U/mg/min, que é a quantidade de H_2O_2 (μmol) formada por minuto por mg de proteína. A quantidade de H_2O_2 formada foi quantificada a partir de uma curva padrão de concentração de H_2O_2 expressa em nmol/minuto.

3.7 Caracterização enzimática

Para a caracterização enzimática da CollinLAAO, a atividade LAAO foi determinada em diferentes condições de pH, temperatura, sobre diferentes substratos e presença de diferentes íons metálicos como descrito a seguir. Os resultados foram expressos em atividade relativa (%) considerando como controle (100%) as seguintes condições: substrato L-Leucina, tampão Tris-HCl pH 7,2 a 25°C (item 3.7.2)

3.7.1 Influência de pH

A influência do pH foi determinada utilizando 500 μL de L-Leucina 0,1% em diferentes tampões, sendo tampão acetato pHs 4,0, 4,5, 5,0 e 5,5, tampão fosfato pH 6,0, Hepes 6,0, 7,0 e 7,5 e Tris-HCl pH 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 e 10,0. As soluções foram incubadas com 2 μg de CollinLAAO em temperatura ambiente por 15 minutos, e em seguida, 5 μL de OPD 2 mM e 1 U/mL de peroxidase de rabanete foram adicionados para um período de reação de 30 minutos. A reação foi interrompida pela adição de 500 μL de ácido cítrico (10% v/v) e a absorbância de cada solução foi lida a 490 nm.

3.7.2 Influência da temperatura

Para este ensaio, 500 μL de L-Leucina 0,1% em tampão Tris-HCl 0,1M pH 7,2 foram incubados com 2 μg de CollinLAAO por 15 minutos em diferentes temperaturas: -80, -20, 0, 25, 37, 100°C e temperatura ambiente. Após essa primeira incubação adicionou-se 5 μL de OPD 2 mM e 1 U/mL de peroxidase de rabanete, sendo posteriormente incubados por 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 500 μL de ácido cítrico (10% v/v) e lida as absorbâncias a 490 nm.

3.7.3 Influência de íons metálicos

Neste ensaio, 500µL de L-Leucina 0,1% em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,2 contendo 5 mM de 6 diferentes sais: CaCl₂, KCl, NaCl, ZnSO₄, CuSO₄ e MgSO₄ foram incubados com 2 µg de CollinLAAO por 15 minutos. Em seguida 5 µL de OPD 2 mM e 1 U/mL de peroxidase de rabanete foram adicionados e incubados por um período de 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 500 µL de ácido cítrico (10% v/v) e lida as absorbâncias a 490 nm.

3.7.4 Atividade sobre diferentes substratos

A CollinLAAO (2 µg) foi incubada com 500 µL de soluções distintas contendo 5 mM dos seguintes aminoácidos: L-Leucina (apolar), L-Serina (polar), L-Glutamato (carregado negativamente) e L-Arginina (carregado positivamente) em tampão Tris-HCl 0,1 M pH 7,2 por 15 minutos. Em seguida adicionou-se 5 µL de OPD 2 mM e 1 U/mL de peroxidase de rabanete por um período de 30 minutos. As reações foram interrompidas pela adição de 500 µL de ácido cítrico (10% v/v) e lida as absorbâncias a 490 nm.

3.7.5 Avaliação da estabilidade da CollinLAAO

A atividade enzimática da CollinLAAO foi monitorada por 49 dias a partir de sua purificação. As amostras da enzima utilizadas estavam aliquotadas e armazenadas em tampão AMBIC 10 mM pH 8,0 a 4 °C protegidas da luz. Os ensaios foram realizados de acordo com o ensaio de atividade LAAO previamente descrito (item 3.6).

3.8 Cultura de promastigotas e macrófagos

As cepas de *L. (V.) braziliensis* (linhagem MHOM/BR/75/M2904) *L. (L.) amazonensis* (linhagem IFLA/BR/67/PH8), *L. (L.) infantum* (linhagem MCER/BR/79/M6445) em sua forma promastigota foram cultivadas em meio LIT pH 7,4 suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina (100 U/mL) e 1% de estreptomicina (100 µg/mL), 2 % de glicose, incubadas em estufa B.O.D à 23 °C ±

0,5 °C. A linhagem celular de macrófagos murinos RAW 264.7 TIB-71 foi cultivada em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 °C.

3.9 Ensaio de citotoxicidade

Os ensaios de citotoxicidade na presença da CollinLAAO foram realizados com as formas promastigotas de *Leishmania (V.) braziliensis*, *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infantum* pelo ensaio de MTT segundo Mosmann (1983). Promastigotas (1×10^5 promastigotas/poço) foram dispostos em placas de cultura de 96 poços e incubados por 24h com diferentes concentrações de CollinLAAO (200 a 0,195 µg/mL para *L. (V.) braziliensis* e 50 a 0,195 µg/mL para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*) em estufa B.O.D à 23 °C ± 0,5 °C em meio LIT pH 7,4 suplementado com 10% de FBS, 1% de penicilina (100 U/mL) e 1% de estreptomicina (100 µg/mL), 2 % de glicose. O controle negativo representa ausência de tratamento, recendo em seu lugar apenas PBS 1x, as demais condições seguiram iguais ao grupo tratados. Após 24h, os promastigotas foram incubados com 5 mg/mL de MTT (brometo de 3-(4,5 -dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) durante 3h. Os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100 µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01M de HCl. Após 18h a absorbância foi medida em um espectrofotômetro de múltiplos poços (multiskanGO, Thermo scientific) a 570nm. Para *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum* os ensaios foram repetidos adicionando catalase (150 U/mL) juntamente ao tratamento com a toxina.

Macrófagos RAW 264.7 (5×10^4 células/poço) foram dispostos em placas de cultura de 96 poços e incubados por 24h com diferentes concentrações de CollinLAAO (50 a 0,048 µg/mL) em meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) e incubados em estufa umidificada contendo 95% de ar e 5% de CO₂ a 37 °C. Após 24h, os macrófagos foram incubados com 5 mg/mL de MTT (brometo de 3-(4,5 -dimetiltiazol-2-il)-2,5-difenil tetrazólio) durante 3h. Os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100 µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01M de HCl. Após 18h a absorbância foi medida em um espectrofotômetro de múltiplos poços

(multiskanGO, Thermo scientific) a 570nm.

Foram realizados 3 experimentos independentes com triplicatas para cada concentração. Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism Software version 5, onde foram calculados valores de IC₅₀, os gráficos foram gerados e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

3.10 Produção de espécies reativas de oxigênio (EROs)

Formas promastigotas ($2,5 \times 10^6$ parasitos/poço) de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infatum* foram cultivadas com meio LIT completo (controle) ou com diferentes concentrações da CollinLAAO (0,78 e 0,39 µg/mL), em placa de 24 poços à $23^\circ\text{C} \pm 0.5^\circ\text{C}$ na B.O.D. por 6h. Em seguida, os parasitos foram centrifugados a 100 xg por 7 minutos e lavados com PBS e incubados com 20 µM da sonda CM-H₂DCFDA (5-(e 6)-clorometil-2',7'-diclorodihidrofluoresceína diacetato acetil ester - Sigma) e 10 µg/mL de PI por 1h protegido da luz na B.O.D. Controles positivos para PI e EROs foram feitos incubando previamente os parasitos com 4% (v/v) de formol (30 minutos), e com 20 µM de H₂O₂ (Sigma - 20 minutos), respectivamente; e, posteriormente lavando com PBS e incubando com 10 µg/mL de PI e 20 µM da sonda CM-H₂DCFDA por 1h. Para este teste, pelo menos 20.000 eventos foram obtidos em cada grupo (controle, tratados e controles positivos para PI e EROs) em citômetro de fluxo (FACSCantoll, BD Biosciences) utilizando os canais FITC-A e PE-A. O software *Kaluza analysis* foi utilizado para realização da estratégia de *gating* e análise da intensidade de fluorescência.

Três experimentos independentes foram realizados em triplicatas para cada concentração. Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism Software version 5, onde os gráficos foram gerados e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

3.11 Avaliação da alteração do dano de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi\text{m}$)

Formas promastigotas ($2,5 \times 10^6$ parasitos/poço) de *Leishmania (L.) amazonensis* e *Leishmania (L.) infatum* foram cultivadas com meio LIT completo

(controle) ou com diferentes concentrações da CollinLAAO (1,56, 0,78 e 0,39 µg/mL), em placa de 24 poços à 23°C ± 0.5°C na B.O.D t. Após 24h, os parasitos foram lavados em PBS e incubados com a sonda Rh 123 (Sigma Aldrich) (15 µg/mL) por 15 minutos a 25 °C com proteção contra luz. Posteriormente, os parasitos foram lavados novamente com PBS, fixados com 1% de paraformaldeído em tampão cacodilato por 10 minutos, lavados e armazenados em tampão PBS. A análise da população celular foi feita em citômetro de fluxo (FACSCanto II, BD Biosciences), e no mínimo, 20.000 eventos foram contabilizados na região previamente estabelecida como correspondente aos parasitos. O *software Kaluza analysis* foi utilizado para realização da estratégia de *gating* e análise da intensidade de fluorescência. Foram realizados 3 experimentos independentes com triplicatas para cada concentração. Os dados obtidos foram transferidos para o software GraphPad Prism Software version 5, onde os gráficos foram gerados e realizou-se a análise estatística para interpretação dos dados.

3.12 Ensaio de infectividade

Macrófagos RAW 264.7 ($2,5 \times 10^5$) foram dispostos em lamínula circular 13 mm dentro de placa de 24 poços e incubados com meio RPMI 1640 suplementado com 5% de SFB, 1% de penicilina (100 U/mL) e estreptomicina (100 µg/mL) em estufa a 5% de CO₂ e 37°C por 3 horas para adesão. Após isso, formas promastigotas de *L. (L.) infantum* (5×10^6) foram adicionadas aos macrófagos aderidos, na razão 20 parasitos: 1 célula, juntamente com duas concentrações de CollinLAAO (0,78 e 0,39 µg/mL), o grupo controle não recebeu tratamento. Após duas horas de infecção, as promastigotas não internalizadas foram removidas por lavagem de PBS. As lamínulas foram então fixadas com 2% de formaldeído, corados com Giemsa e analisados por microscopia ótica. Foram contadas 100 células por lamínula sendo 4 lamínulas por tratamento. O índice de infectividade foi calculado pela multiplicação de macrófagos infectados pelo número de amastigotas/macrófago.

3.13 Análise Estatística

A análise estatística foi realizada pelo *One-Way ANOVA* seguida de teste de comparações múltiplas *Tukey post test* (GraphPadPrism Software version 5). Para todos os testes foi considerado significativo $p < 0,05$ (*).

4.0 RESULTADOS E DISCUSSÃO

4.1 Isolamento e caracterização bioquímica parcial da CollinLAAO

A CollinLAAO foi isolada com sucesso utilizando apenas 2 passos cromatográficos. Primeiramente a peçonha de *C. d. collilineatus* foi aplicada na resina Sephadex G-75 resultando em duas frações: G1 e G2 (figura 7A). Ambas as frações foram testadas tubo a tubo para atividade enzimática de LAAO, sendo que apenas a fração G1 apresentou atividade e foi concentrada e passada para o tampão de início da segunda etapa (AMBIC 0,05 M). Para o segundo passo cromatográfico foi utilizada resina aniônica Hitrap Capto DEAE. O fracionamento resultou em 3 picos distintos (D1, D2 e D3) (figura 7B), novamente todas as três frações foram testadas quanto à atividade enzimática tubo a tubo afim de determinar a presença da LAAO, apenas a fração denominada D2 apresentou atividade enzimática.

A análise em SDS-PAGE da subfração ativa de LAAO D2, em condições não redutoras, revelou uma única banda (figura 7C) que foi denominada de CollinLAAO. A análise do grau de pureza da CollinLAAO por HPLC de fase reversa revelou a presença de dois picos, sendo o primeiro pertencente ao FAD e o segundo, com maior absorvância da estrutura proteica da CollinLAAO, apresentando um bom grau de homogeneidade (figura 7D). A massa molecular da CollinLAAO foi estimada em 63,1 kDa pela distância de migração relativa (R_f) das bandas do padrão de peso molecular e da banda da LAAO em SDS-PAGE (figura 8).

As SV-LAAOs descritas na literatura foram isoladas usando estratégias cromatográficas similares, que consistem em um primeiro fracionamento por cromatografia de exclusão molecular seguida de cromatografia de interação hidrofóbica e/ou troca iônica, sendo a maioria trocadoras aniônicas e em alguns casos pode haver mais que dois passos cromatográficos (IZIDORO, et al., 2014).

Teixeira e colaboradores (2016) isolaram uma LAAO de *C. d. terrificus* utilizando duas etapas cromatográficas, primeiramente em resina gel filtração G-75 Sephadex seguida de cromatografia hidrofóbica Phenyl Sepharose FF. A LAAO isolada de *C. d. cumanensis* utilizou como primeiro passo exclusão molecular Sephacryl S-200 seguida de RP-HPLC, já o isolamento da LAAO de *C. d.*

cascavella consistiu em dois passos de exclusão molecular, uma Superdex 75 seguida de Sephadex G-75 (TOYAMA, et al., 2006; VARGAS, et al., 2013). Resinas trocadoras aniônicas foram comumente empregadas no isolamento de LAAOs de diferentes peçonhas. Como o isolamento da LAAO de *Bothrops jararaca* (CISCOTTO et al., 2009, da Dr-LAO de *Daboia ruselli* (CHEN et al., 2012), BI-LAAO de *Bothrops leucurus* (terceira etapa) (NAUMANN, et al., 2011), e a ACTX-8 de *Agkistrodon acutus* (primeira etapa) (ZHANG; WEI, 2007).

As SV-LAAOs geralmente são dímeros com massa molecular variando entre 100 a 140 kDa e 50 a 70 kDa quando analisadas por espectrometria de massa representando seus monômeros. A CollinLAAO apresentou-se dentro dessa faixa, com massa molecular relativa estimada em 63,1 kDa. As SV-LAAOs de outras serpentes do mesmo gênero, *C. d. cascavella*, *C. d. cumanensis* e *C. d. terrificus* possuem massa molecular de 65, 55 e 117 kDa, respectivamente (TOYAMA, et al., 2006; VARGAS, et al., 2013; TEIXEIRA et al., 2016). Outras SV-LAAOs apresentam massa molecular distinta, como a LAAO de *Bothrops jararaca* (38,2 kDa) e ACTX-8 (28 kDa) de *Agkistrodon acutus* (ZHANG; WEI, 2006; CISCOTTO et al., 2009).

A peçonha de *C. d. collilineatus* constitui-se uma boa fonte de LAAO, as quais são enzimas instáveis e estão propensas a perder atividade durante os processos de purificação. A metodologia de purificação da CollinLAAO foi bastante satisfatória, pois em apenas duas etapas de purificação, a proteína foi obtida com alto grau de homogeneidade e bom rendimento proteico (2,5 %) (Tabela 1). SV-LAAOs geralmente representam de 0,15 a 5% da peçonha bruta de serpentes, com algumas exceções, como a LAAO isolada de *Bungarus caeruleus*, a qual representa 25% das proteínas totais (IZIDORO et al., 2014).

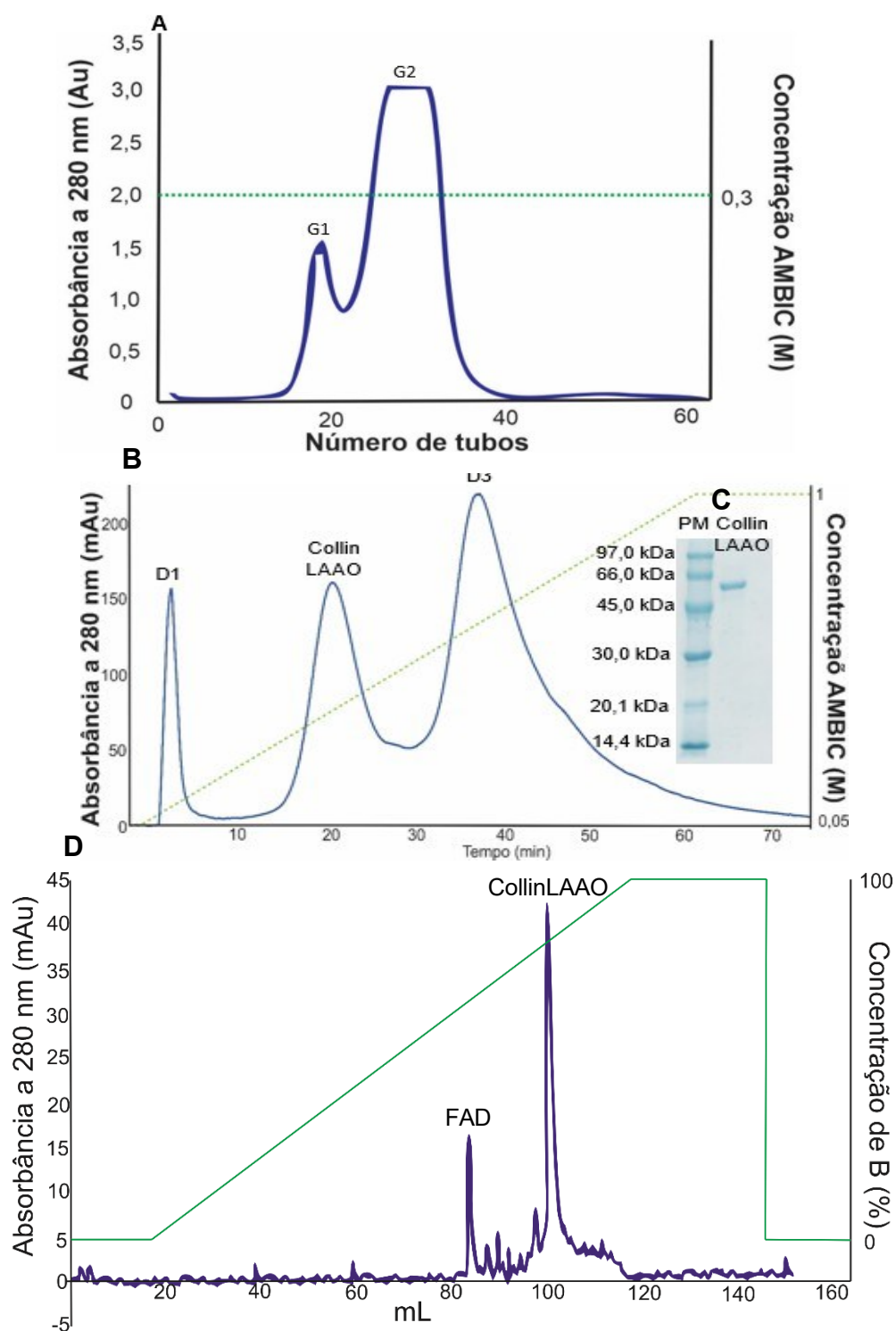


Figura 7. Isolamento da CollinLAAO. (A) Cerca de 200 mg de peçonha de *C.d.collilineatus* foi dispersa em resina de filtração molecular Sephadex G-75 (95cm x 9 mm) e eluída sem gradiente em AMBIC 0,3 M pH 8,0 sob fluxo constante de 15 mL/h; (B) 20 mg da fração G1 foi aplicada a coluna HiTrap Capto DEAE acoplada ao sistema AKTA GE HealthCare e eluída sob gradiente linear

de AMBIC 0,05M a 0,1M pH 8,0 em fluxo constante de 0,1mL/min; **(C)** SDS-PAGE 12,5% contendo P.M – padrão de massa molecular: Fosforilase b (97,0 kDa), Soro albumina bovina (66,0 kDa), ovoalbumina (45,0 kDa), Anidrase Carbônica (30,0 kDa), Inibidor de Tripsina (20,1 kDa) e α -lactoalbumina (14,4 kDa); e CollinLAAO; **(D)** Cerca de 300 μ g de CollinLAAO foram aplicados em uma coluna de HPLC de fase reversa C18 (Phenomenex 125 x 4,5 mm), previamente equilibrada com 0,1% (v/v) de ácido trifluoroacético (TFA). A eluição foi realizada em fluxo de 1 mL/min, usando um gradiente de concentração linear de 0,1% de TFA (v/v) (A) e 70% de acetonitrila (v/v) (B), como segue: 100% A (5 min), 0-100% B (35 min), 100% B (10 min), 100% A (10 min).

Tabela 1. Rendimento proteico da CollinLAAO obtida no fracionamento da peçonha de *C. d. collilineatus* em Sephadex G-75 e Capto-DEAE

AMOSTRA	MASSA (mg)*	RECUPERAÇÃO (%)
PEÇONHA DE <i>C. d. c.</i>	179,7	100
G1	39,48	21,96
G2	116,31	64,72
D1	1,54	0,86
D2 (CollinLAAO)	4,5	2,5
D3	17,19	9,56

*Dosagem de proteínas pelo método de Bradford (1976)

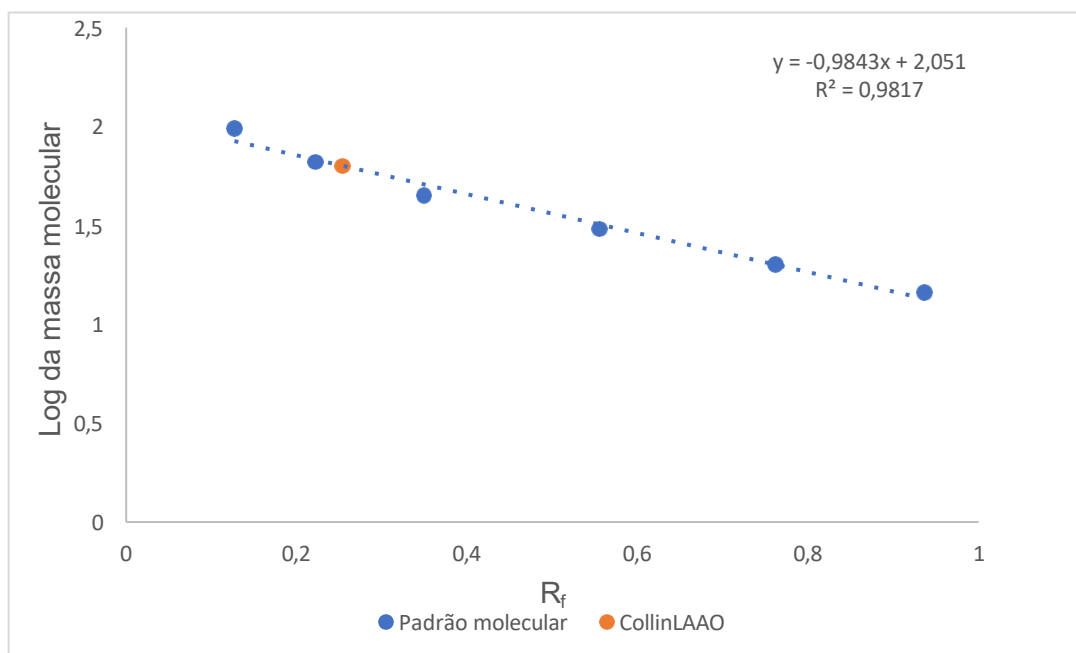


Figura 8. Cálculo da massa molecular da CollinLAAO: Gráfico da relação entre log da massa molecular do padrão de peso molecular versus o coeficiente R_f de migração de bandas, contendo coeficiente de determinação R^2 (0,9817) e equação linear de reta. A massa molecular da CollinLAAOs foi determinada por regressão linear. O padrão de massa molecular consiste em: Fosforilase b (97,0 kDa), Soro albumina bovina (66,0 kDa), Ovoalbumina (45,0 kDa), Anidrase Carbônica (30,0 kDa), Inibidor de Tripsina (20,1 kDa) e α -Lactoalbumina (14,4 kDa).

4.2 Caracterização enzimática da CollinLAAO

A estabilidade da atividade enzimática foi testada em diferentes condições de pH, temperatura, substratos e presença de íons. A CollinLAAO não apresentou nenhuma atividade em $\text{pH} \leq 5,0$, na faixa de $\text{pH} 6,0 - 9,0$, a CollinLAAO apresentou atividade média próxima a 80%, indicando uma boa faixa de atividade. Entretanto, a enzima apresentou um aumento de sua atividade nos pHs mais alcalinos de 9,5 e 10,0 (figura 9A). A CollinLAAO apresentou baixa atividade (menor que 50%) em temperaturas de 37 °C, 100 °C e -80 °C, e maior atividade nas temperaturas de 25°C e 0 °C (figura 9B)

A atividade enzimática da CollinLAAO sofreu alterações devido a presença de íons metálicos. Sais contendo os íons monovalentes Na^+ e K^+ inibiram completamente sua atividade, enquanto a presença de Zn^{2+} , Cu^{2+} e Mg^{2+} reduziu a atividade da enzima para aproximadamente 60%. Já a presença de Ca^{2+} levou a

uma diminuição da atividade para próximo de 80% (figura 9C). Quanto a presença de diferentes substratos, a CollinLAAO demonstrou alta atividade sobre a L-Leucina, e baixa atividade sobre L-Arginina, e nenhuma atividade foi registrada na presença de L-Serina e L-Glutamato (figura 9D).

Outro parâmetro analisado foi a estabilidade enzimática por 49 dias após o isolamento. A CollinLAAO apresentou atividade inicial (primeiro dia) próxima a 3000 U/mg/min, ao final de 21 dias a enzima apresentou a atividade reduzida pela metade (figura 9E), para tais testes a enzima foi mantida armazenada em solução AMBIC 10 mM, pH8,0 a 4°C protegida da luz.

Em geral as SV-LAAOs são altamente sensíveis a mudanças de temperatura e pH, podendo ser enzimaticamente inativadas, por isso, é indicado seu armazenamento em solução de pH neutro a 4 °C protegidas da luz (DU; CLEMETSON, 2002). As SV-LAAOs podem ser inativadas principalmente em pHs ácidos, geralmente menores que 5,5 ou pH alcalinos, geralmente superior a 9,0 (IZIDORO et al., 2014), entretanto a desnaturação pode ser revertida em algumas enzimas quando estas são postas em solução com pH próximos ao neutro (pH 5,5 a 9,0) (COLES; EDMONDSON; SINGER, 1977). Nesse contexto, a CollinLAAO apresentou resultados similares, perdendo sua atividade em pHs menores que 5,5, mantendo sua atividade na faixa de pH de 6,5 a 8,5, entretanto, a enzima apresentou sua maior atividade em pHs alcalinos acima de 9,0, destoando-se de outras LAAOs, que exibem faixa de pH ótima entre 5,5 a 9,0 (BREGGE-SILVA et al., 2012; BORDON et al., 2015; SALAMA et al., 2018).

Alguns estudos indicam que as SV-LAAOs podem permanecer ativas por períodos de tempo variáveis em uma ampla faixa de temperatura (0 a 50 °C), mas temperaturas acima de 55 °C resultam em gradual decréscimo de atividade causada por alterações de interações hidrofóbicas e ligações de hidrogênio entre as subunidades da enzima, além disso são enzimas sensíveis a congelamento e liofilização (IZIDORO et al., 2014; COSTA et al., 2018). Esses tipos de inativação induzem mudanças conformacionais que podem ser demonstradas por dicroísmo circular (MACHEROUX et al., 2001). A CollinLAAO, ao contrário de muitas outras SV-LAAOs, não apresentou completa perda de atividade em temperaturas menores que 0 °C. Após ser mantida em -80°C, a atividade da enzima foi reduzida cerca de 50%, a - 20 °C a enzima apresentou atividade superior a 50% e a 0 °C a atividade

chegou próximo a 100%. Porém a CollinLAAO foi mais sensível ao aumento de temperatura que outras enzimas da classe tendo sua atividade reduzida a valores menores que 50% nas temperaturas de 37 °C e 100 °C. A BmooLAAO-I apresentou melhor atividade nas temperaturas de 55 e 60 °C, enquanto para a BjussuLAAO-II foi de 60 e 65 °C, ambas enzimas apresentaram apenas 20% de atividade a 25 °C e aproximadamente 50% de atividade a 37 °C (COSTA et al., 2018).

A presença de íons pode modular positiva ou negativamente a atividade enzimática de algumas SV-LAAOs. O efeito de inibição das enzimas pode estar relacionado com a ligação reversível dos íons ao grupo tiol das cisteínas presentes no sítio ativo, o que pode comprometer suas propriedades farmacológicas (BENDER; BRUBACHER, 1977). Geralmente os íons bivalentes apresentam maior interferência na atividade, ao exemplo da LAAO de *Crotalus adamanteus* que precisa de Mg^{2+} (PAIK; KIM, 1965), enquanto as enzimas de *Lachesis muta* e *Bothrops brazili* são inibidas pela presença de Zn^{2+} (SOLIS, et al., 1999; CISNEROS, 1996). BmooLAAO-I e BjussuLAAO-II apresentaram redução significativa de suas atividades quando expostas aos íons bivalentes Zn^{2+} , Cu^{2+} e Ni^{2+} e ao íon trivalente Al^{3+} (COSTA et al., 2018). A CollinLAAO também apresentou redução de atividade na presença dos íons bivalentes Ca^{2+} , Zn^{2+} , Cu^{2+} e Mg^{2+} , porém, teve sua atividade completamente inibida na presença dos íons monovalentes Na^{+} e K^{+} , demonstrando novamente perfil diferente da maioria das SV-LAAOs já isoladas.

Estudos cinéticos sugerem que as SV-LAAOs apresentam especificidade por aminoácidos hidrofóbicos e aromáticos, enquanto sua afinidade por aminoácidos básicos e ácidos é diminuída. Tal fato pode ser explicado pela presença de três regiões hidrofóbicas no sítio de ligação ao substrato, e, portanto, aminoácidos carregados positivamente como L-Arginina exibem interações eletrostáticas desfavoráveis com o sítio catalítico (IZIDORO et al., 2014; COSTA et al., 2018). A CollinLAAO apresentou propriedades bioquímicas semelhantes a outras LAAOs descritas na literatura, demonstrando boa atividade sobre a L-Leucina, um aminoácido apolar, além disso apresentou atividade de aproximadamente apenas 10% quando incubada com L-Arginina (carregado positivamente) e nenhuma atividade sobre L-Serina (polar) e glutamato (carregado negativamente). Algumas SV-LAAOs apresentam maior especificidade para

L-Leucina, como é o caso da LAAO de *Crotalus cumanensis* (VARGAS et al., 2013) *Lachesis muta* (BREGGE-SILVA et al., 2012) e *Daboia rusellis* (CHEN et al., 2012), enquanto outras enzimas apresentam maior afinidade pelo aminoácido fenilalanina, como a LAAO isolada de *Cerastes cerastes* (ABDELKAFI-KOUBAA, et al., 2014) e de *Bothrops pirajai* (IZIDORO et al., 2006).

A CollinLAAO armazenada a 4 °C apresentou atividade enzimática de 100% apenas por 7 dias, com decréscimo de 50% de sua atividade em 21 dias. Esse resultado demonstra que a essa enzima é muito instável, principalmente quando comparada a BmoolLAAO-I e BjussuLAAO-II, que mantiveram sua atividade total por 42 dias (COSTA et al., 2018). Já a Bordoneina-L, uma LAAO isolada de *C. d. terrificus* teve sua atividade reduzida a 50% nos 5 primeiros dias (BORDON et al., 2015), indicando que SV-LAAOs de peçonhas botrópicas são estáveis por mais tempo que as crotálicas.

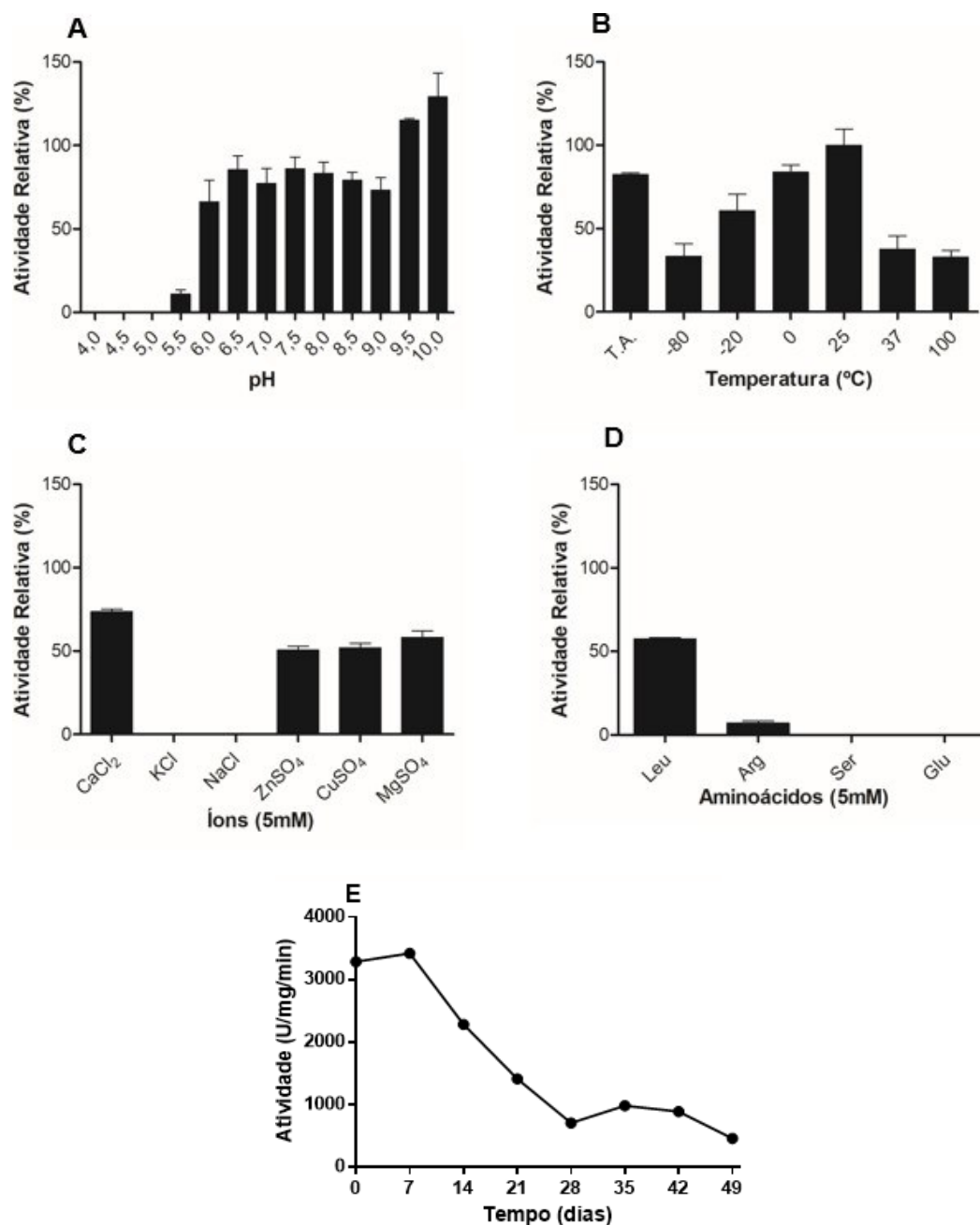


Figura 9. Caracterização enzimática da CollinLAO. Em todos os ensaios foram utilizados 2 µg de enzima, 5µL de OPD (1 mg/100µL em metanol) e 1µL de peroxidase de rabanete (1 mg/mL) em diferentes condições. Os resultados foram expressos em atividade relativa (%) em comparação com atividade enzimática registrada para L-Leucina em tampão Tris-HCl pH 7,2 a 25°C **(A) Influência do pH:** Tampão acetato pHs 4,0, 4,5, 5,0 e 5,5, tampão fosfato pH 6,0, Hepes 6,0, 7,0 e 7,5 e Tris-HCl pH 8,0, 8,5, 9,0, 9,5 e 10,0; **(B) Influência da temperatura:** -80, -20, 0, 25, 37, 100°C e temperatura ambiente; **(C) Influência da presença de íons:** CaCl₂, KCl, NaCl, ZnSO₄, CuSO₄ e MgSO₄; **(D) Diferentes substratos:** L-Leucina, L-Arginina, L-Serina e L-Glutamato todos a 5mM (m/m); **(E) Estabilidade da atividade enzimática** monitorada por 49 dias após o isolamento.

4.3 Avaliação da citotoxicidade da CollinLAAO sobre parasitos do gênero *Leishmania* spp.

Formas promastigotas de diferentes espécies de *Leishmania* spp. foram incubadas por 24h com CollinLAAO em diferentes concentrações (200 a 0,195 µg/mL). Foram determinadas as concentrações que inibem 50% da viabilidade celular (IC₅₀) como sendo: 62,73 µg/mL para *L. (V.) braziliensis*; 45,05 µg/mL para *L. (L.) amazonensis* e 11,66 µg/mL para *L. (L.) infantum* (Figura 10). Como a IC₅₀ para *L. (V.) braziliensis* foi a mais alta (Figura 10A), essa espécie não participou dos testes seguintes, incluindo a análise da citotoxicidade na presença de catalase.

Os efeitos citotóxicos da CollinLAAO apresentaram perfis diferentes entre as espécies de leishmanias pertencentes a diferentes subgêneros. A *L. (V.) braziliensis* é pertencente ao subgênero *Viannia* e possui características morfológicas e metabólicas diferentes das *L. (L.) amazonensis* e *L. (L.) infantum*, podendo ser estas as razões da CollinLAAO ter apresentado maior toxicidade sobre o subgênero *Leishmania* (NEVES, 2016).

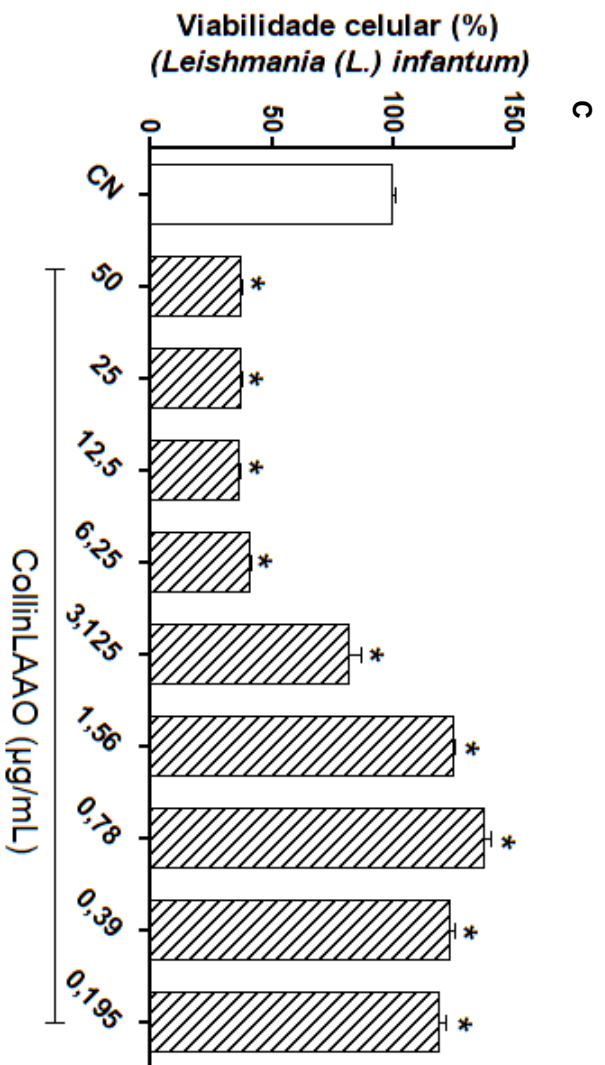
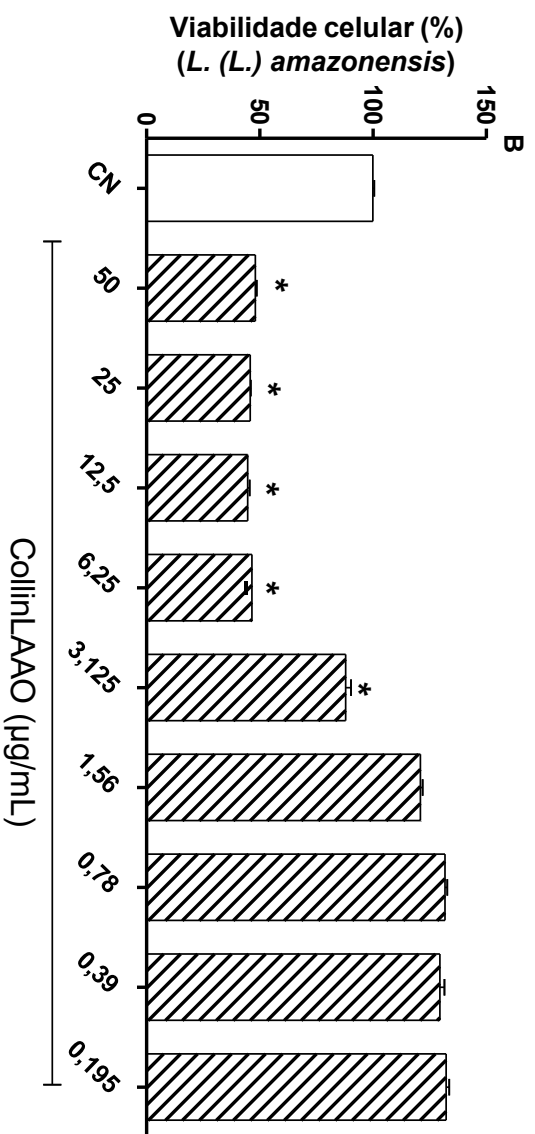
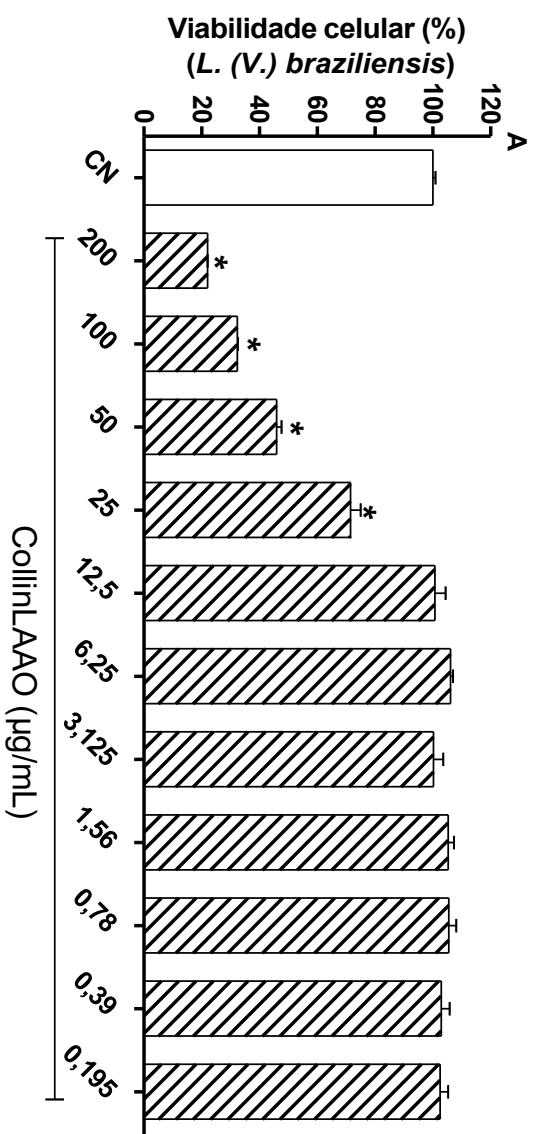
As menores concentrações testadas de CollinLAAO (1,56 – 0,195 µg/mL) não foram capazes de promover a morte das espécies *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* (100% de viabilidade celular), enquanto a concentração de 3,125 µg/mL causou cerca de 20% de morte em ambas as espécies. Já as maiores concentrações testadas (50 - 6,25 µg/mL) mataram 60 e 50% das formas promastigotas, respectivamente (figura 10B e C). Os efeitos citotóxicos da CollinLAAO foram completamente inibidos na presença da enzima catalase (figura 10D e E).

Embora os perfis de citotoxicidade apresentados no teste do MTT para as espécies do subgênero *Leishmania* sejam parecidos, as IC₅₀ determinadas para ambas as espécies, confirmam que a *L. (L.) infantum* é cerca de 3 vezes mais sensível ao tratamento com a CollinLAAO. Alguns autores sugerem que as SV-LAAOs têm a capacidade de ancorar em superfícies específicas presentes na célula hospedeira, indicando que as SV-LAAOs podem apresentar especificidade por diferentes tipos celulares (MOUSTAFA et al., 2006).

A Bp-LAAO isolada de *B. pauloensis* induziu citotoxicidade dose-dependente em diferentes espécies de *Leishmania*, com IC₅₀ de 1,48 µg/mL para *L.*

amazonensis, 1,59 µg/mL para *L. donovani*, 1,03 µg/mL para *L. brasiliensis* e 1,29 µg/mL para *L. major* (RODRIGUES et al., 2009). A LAAO-I de *B. pirajai* induziu morte de maneira dose-dependente em diferentes espécies de *Leishmania*, sendo a *L. brasiliensis* a mais susceptível aos efeitos tóxicos dessa proteína (IZIDORO et al., 2006). A BatroxLAAO também se mostrou eficiente contra diferentes espécies de *Leishmania*, com IC₅₀ de 4,3 µg/mL para *L. donovani*, 23,34 µg/mL para *L. brasiliensis* e 4,5 µg/mL para *L. major* (ALVES-PAIVA et al., 2011).

Em geral a toxicidade exibida pelas SV-LAAOs em leishmanias pode ser inibida pela presença de catalase, indicando que essa classe de proteínas promove a morte desses protozoários por estresse oxidativo. A BpirLAAO-I da peçonha de *B. pirajai*, a LAAO de *B. jararaca* e a BatroxLAAO tiveram sua citotoxicidade totalmente inibida na presença da catalase (IZIDORO et al., 2006; CISCOTO et al., 2009; ALVES-PAIVA et al., 2011). Entretanto, outras SV-LAAOs continuaram a exibir efeitos tóxicos sobre diferentes espécies de *Leishmania* mesmo na presença de catalase. A Bp-LAAO de *B. pauloensis* induziu cerca de 30% de citotoxicidade em *L. major* na presença da catalase (RODRIGUES et al., 2009). Esse resultado reforça a ideia de que as SV-LAAOs possuem alvos celulares e podem desencadear efeitos biológicos independentes da formação de peróxido de hidrogênio.



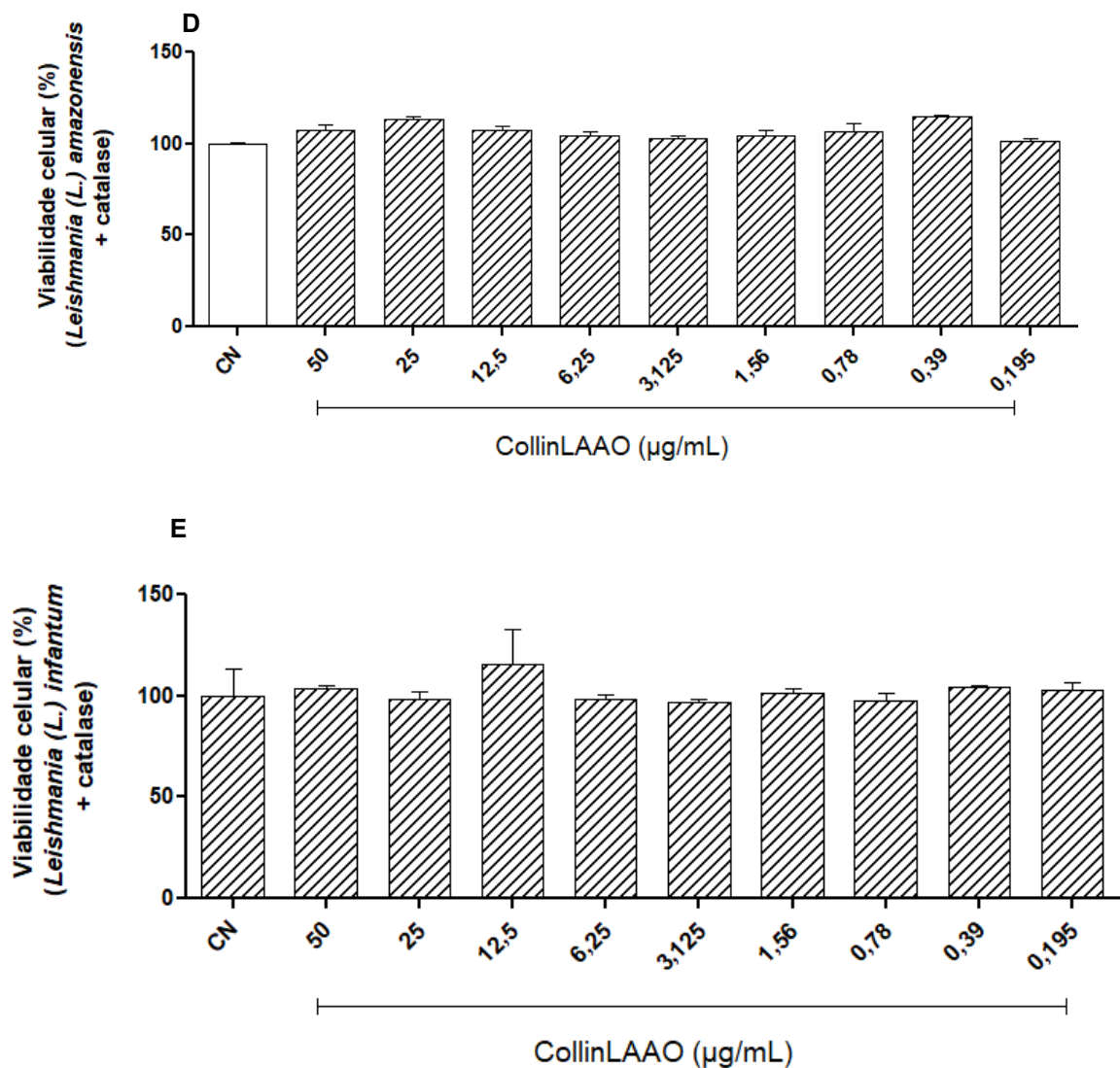


Figura 10. Perfil citotóxico de CollinLAAO sobre diferentes espécies de *Leishmania spp.* Formas promastigotas (1×10^5 promastigotas/poço) foram incubadas com diferentes concentrações de CollinLAAO (200 a 0,195 µg/mL para *L. (V.) braziliensis* e 50 a 0,195 µg/mL para as demais espécies). O controle negativo representa ausência de tratamento, recendo em seu lugar apenas PBS 1x. Após 24h, os promastigotas foram incubados com 5 mg/mL de MTT durante 3h. Os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100 µL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01 M de HCl. Após 18h a absorbância foi verificada a 570 nm. **(A)** Viabilidade em *L. (L.) braziliensis*; **(B)** Viabilidade em *L. (L.) amazonensis*; **(C)** Viabilidade em *L. (L.) infantum*; **(D)** Viabilidade em *L. (L.) amazonensis* na presença de catalase; **(E)** Viabilidade de *L. (L.) infantum* na presença de catalase. A absorbância foi registrada a 570 nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. $p < 0,05$ (*).

4.4 Avaliação da produção de espécies reativas de oxigênio (EROs) intracelular

Com o intuito de investigar os efeitos da CollinLAAO sobre as leishmanias foi realizado o teste para avaliar a concentração de espécies reativas de oxigênio intracelular. As cepas de *L. (L.) infantum* e *L. (L.) amazonensis* foram tratadas com 0,78 e 0,39 µg/mL. Apenas a concentração de 0,78 µg/mL promoveu aumento significativo na fluorescência para ambas espécies (60,97% para *L. (L.) amazonensis* e 284,28% para *L. (L.) infantum*), em comparação ao controle (figura 11A e B), esse resultado nos permite inferir que, em apenas 6h de tratamento uma concentração não citotóxica (0,78 µg/mL) de CollinLAAO promoveu estresse oxidativo nos parasitos testados.

O peróxido de hidrogênio gerado durante a catálise enzimática é altamente tóxico e capaz de atuar em ácidos nucleicos, proteínas e causar peroxidação da membrana plasmática, alterando sua permeabilidade (ANDE et al., 2008; IZIDORO et al., 2014). Esses danos podem ser revertidos ou não pelo sistema de reparo celular. Quando não revertido, as células danificadas podem entrar em apoptose ou mesmo morrerem imediatamente, sem que a célula possa se rearranjar para ser fagocitada (Necrose) (DU; CLEMETSON, 2002).

Em baixas concentrações, EROs como H₂O₂ têm sido associados à indução de respostas de sobrevivência celular, enquanto doses mais altas ativam processos de morte como a apoptose (REDZA-DUTORDOIR; AVERILL-BATES, 2016). Os EROs são capazes de ativar a proteína p53, a qual desempenha um papel fundamental no controle do estresse celular, induzindo a parada do ciclo celular, a fim de promover o reparo e sobrevivência do DNA, ou morte por apoptose, dependendo do contexto (YOSHIDA; MIKI, 2010). Se o estresse oxidativo for baixo, a p53 induz a parada do ciclo celular, reparo de DNA e senescência. No entanto, se o dano for muito grave, a p53 pode regular a apoptose através da regulação negativa de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2, Bcl-XL e IAPs, além de regular positivamente genes pró-apoptóticos da via intrínseca como Bax, Bid, Puma, Noxa e Apaf-1 e da via extrínseca como Faz, FasL, DR-4 e DR-5 (YOSHIDA; MIKI, 2010).

Apoptose induzida por peróxido de hidrogênio foi demonstrada estar relacionada com o aumento da expressão de p53, Puma, Noxa e Bax em diversos

tipos celulares em glioma, câncer de cólon, carcinoma cervical humano e células HeLa (DATTA et al., 2002; YU; ZHANG, 2008; PALLEPATI; AVERILL-BATES; 2010).

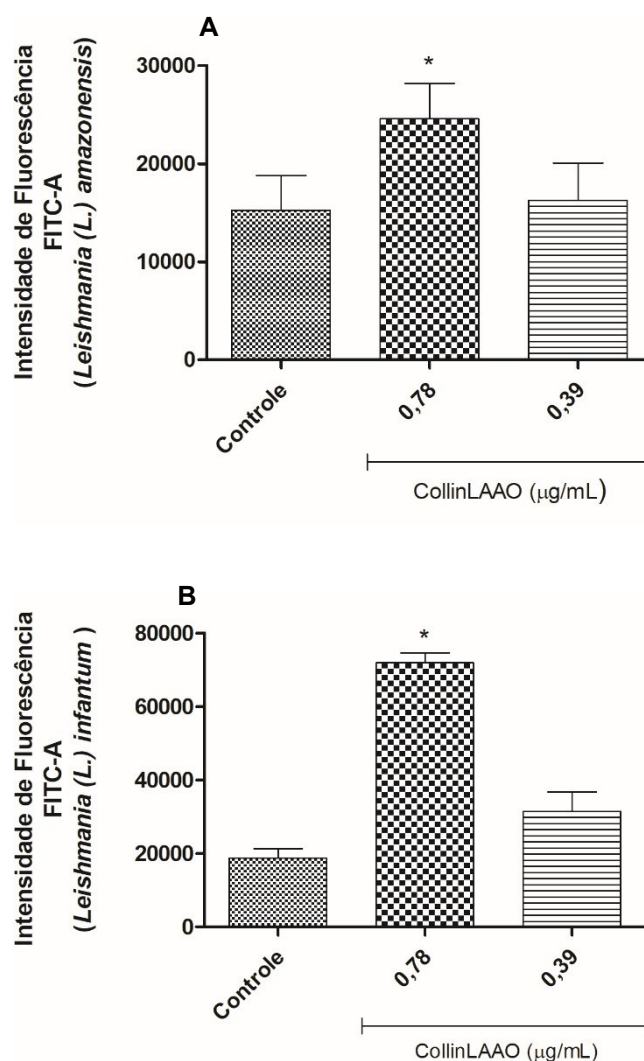


Figura 11. Produção de EROs em *Leishmania* spp. induzida por CollinLAAO. Formas promastigotas ($2,5 \times 10^6$ /poço) foram tratadas com meio LIT completo (controle) ou CollinLAAO nas concentrações 0,78 e 0,39 µg/mL. O controle negativo consistiu na incubação de promastigotas (1×10^5 por poço) apenas com PBS. Após 6h os parasitos foram incubados com a sonda CM-H₂DCFDA e PI. A análise foi realizada por citometria de fluxo com mínimo de 20.000 eventos analisados. Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência relativa. **(A)** *L. (L.) amazonensis*; **(B)** *L. (L.) infantum*. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. $p < 0,05$ (*).

4.5 Avaliação da alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$)

O potencial mitocondrial das leishmanias foi avaliado com o intuito de verificar se doses subtóxicas (0,39 a 1,56 $\mu\text{g/mL}$) de CollinLAAO afetam o potencial da membrana mitocondrial. Para *L. (L.) amazonensis* apenas as concentrações de 1,56 e 0,78 $\mu\text{g/mL}$ foram capazes de reduzir significativamente a intensidade de fluorescência em relação ao controle (redução de 91,73 e 92,25% respectivamente) (figura 12A). Enquanto, para *L. (L.) infantum* as três concentrações testadas promoveram a redução significativa do potencial mitocondrial, sendo essa redução de 93,56, 92,87 e 63,37% para as concentrações de 1,56, 0,78 e 0,39 $\mu\text{g/mL}$, respectivamente (figura 12B).

A respiração mitocondrial envolve uma série de reações redox que criam um gradiente eletroquímico resultado da diferença na concentração de prótons no espaço intermembranas para geração de ATP, portanto, em condições normais o potencial mitocondrial é mais negativo que a do citosol. Esse potencial pode ser medido utilizando substâncias lipofílicas e catiônicas, como a dihidrorodamina 123 que possui um grupo éster, conferindo um grau de lipofilicidade e quando interiorizada pela célula alvo é oxidada, conferindo carga positiva a sua estrutura, facilitando o acúmulo da rodamina 123 no interior da mitocôndria. Mitocôndrias danificadas ou em processo de despolarização dificultam a marcação por rodamina 123 (VILAMENA, 2017).

É conhecido na literatura que parasitos do gênero *Leishmania* possuem somente uma mitocôndria, sendo locais chave para suprimento energético, assim como responsáveis pelo balanço entre viabilidade e morte do parasito. Portanto disfunções na mitocôndria podem prejudicar e interferir na sobrevivência dos parasitos (COOMBS et al., 1986; LOEFFLER; KROEMER, 2000; COSTA et al., 2019).

A CollinLAAO nas concentrações de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ e 0,39 $\mu\text{g/mL}$ foi capaz de aumentar o estresse oxidativo intracelular e ainda causar danos a mitocôndria de ambas as espécies do parasito, entretanto, são doses que apresentam sobrevivência de 100%. Tais resultados sugerem que mesmo em concentrações subtóxicas a CollinLAAO é capaz de causar danos oxidativos aos parasitos.

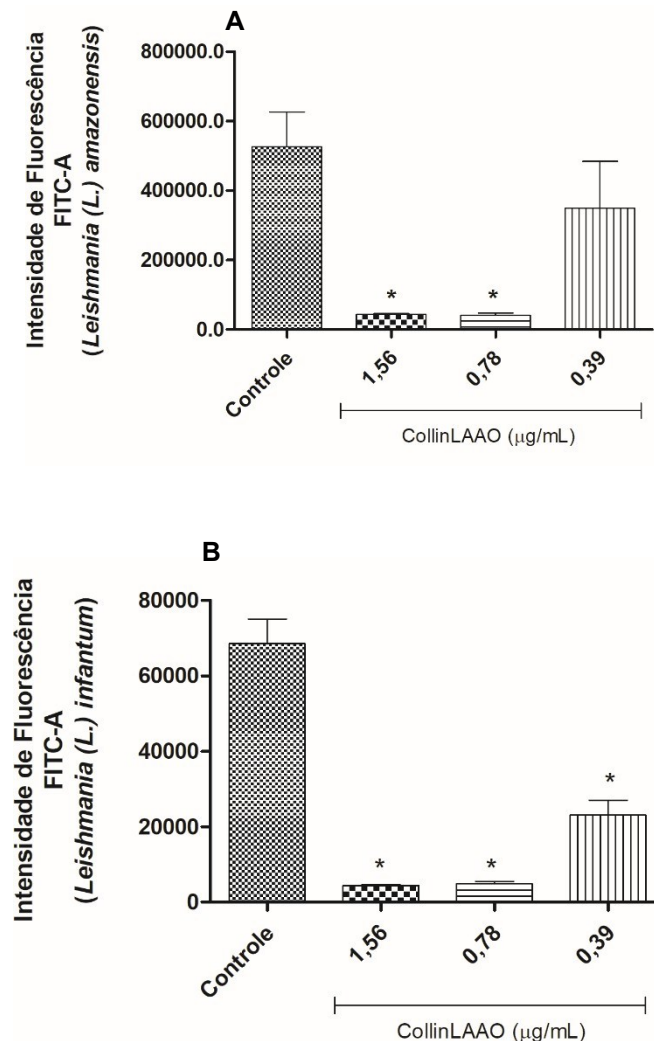


Figura 12. Alteração do potencial de membrana mitocondrial ($\Delta\Psi_m$) induzido por CollinLAAO em *Leishmania* spp. As formas promastigotas ($2,5 \times 10^6$ /poço) foram tratadas com meio LIT completo (controle) ou CollinLAAO nas concentrações 1,56, 0,78 e 0,39 µg/mL por 24h e posteriormente incubadas com rodamina 123 (Rh 123). A análise se deu por citometria de fluxo com mínimo de 20.000 eventos analisados. Os resultados foram expressos em intensidade média de fluorescência relativa. Foram feitos 3 experimentos independentes em triplicata $p < 0,05$ (*). **(A)** *Leishmania L. (L.) amazonensis*; **(B)** *Leishmania L. (L.) infantum*.

4.6 Efeitos da CollinLAAO sobre viabilidade celular de macrófagos RAW 264.7 e infectividade parasitária

Para a realização do ensaio de infectividade de promastigotas de *L. (L.) infantum* sobre macrófagos hospedeiros, inicialmente foi necessário analisar a

viabilidade celular de macrófagos RAW quando tratados com CollinLAAO. As *Leishmanias spp.* são parasitos intracelulares obrigatórios, que utilizam macrófagos como células hospedeiras (BESTEIRO et al., 2007).

A CollinLAAO foi citotóxica para os macrófagos com uma IC_{50} de 0,55 $\mu\text{g/mL}$ (figura 13). As concentrações de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ e 0,39 $\mu\text{g/mL}$ foram selecionadas para o ensaio de inibição de infectividade. O tratamento de formas promastigotas de *L. (L.) infantum* com CollinLAAO diminuiu significativamente a capacidade desses parasitos em infectar macrófagos RAW (Figura 13 A). A concentração de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ apresentou índice de infectividade de 353,74 ($\pm 27,25$), enquanto que a de 0,39 $\mu\text{g/mL}$ apresentou 327,23 ($\pm 16,09$), ambas concentrações foram capazes de reduzir significativamente a infectividade parasitária (26,41% e 31,85%, respectivamente) (figura 14A) quando comparadas ao controle sem tratamento, cujo índice foi de 480,22 ($\pm 29,97$) (Tabela 2).

As leishmanias são introduzidas ao interior do macrófago envoltas pelo vacúolo fagocitário, onde permanecem se reproduzindo (SACKS; NOBEN-TRAUTH, 2002). Nas imagens de microscopia, os macrófagos do grupo controle (figura 14B), ou seja, sem tratamento da CollinLAAO, apresentam poucos vacúolos, sendo que este geralmente contém parasitos. Enquanto em ambos os grupos tratados há um maior número de vacúolos podendo estes não apresentarem parasitos em seu interior (figura 14C e 14D). Os macrófagos estão indicados pela seta verde, apresentando citoplasma bem corado com núcleo de coloração mais clara. As setas vermelhas indicam as leishmanias presentes dentro do vacúolo (figura 14B).

Mamíferos e tripanossomatídeos apresentam diferentes sistemas redox contra ação de espécies reativas de oxigênio. Enquanto mamíferos possuem o sistema glutathiona, os tripanossomatídeos dispõem do sistema tripanotiona (BEIG et al., 2013). No sistema tripanotiona, a enzima TXPNx é capaz de reduzir espécies reativas de oxigênio, porém de maneira muito mais lenta do que a glutathiona, isso acontece devido a diferenças em seus sítios de ligação com substrato (SCHMIDT e KRAUTH-SIEGEL, 2002), e indica uma maior sensibilidade dos parasitos a EROs. A baixa atividade da TXPNx pode ser compensada por altas concentrações da enzima nas células (aproximadamente 6% do total das proteínas solúveis em *Crithidia fasciculata*, *T. brucei*, *T. cruzi*, *L. major* e *L. donovani*) (SCHMIDT e

KRAUTH-SIEGEL, 2002). Tal compensação pode ser o motivo da CollinLAAO apresentar maior toxicidade sobre macrófagos murinos do que em *Leishmania spp.*, além da presença de alvos na superfície celular de macrófagos, podendo indicar diferentes especificidades da enzima.

Os ensaios realizados nesse trabalho sugerem que ao CollinLAAO, mesmo em concentrações subtóxicas, é nociva para a sobrevivência das leishmanias, pois esta pode induzir um aumento da concentração intracelular de EROs, alterando o potencial elétrico mitocondrial, e diminuindo a capacidade do parasito em invadir células hospedeiras.

Costa e colaboradores (2019) demonstraram os efeitos leishmanicida induzidos por complexos de rutênio. No trabalho verificou-se um aumento de EROs intracelular, bem como diminuição do potencial mitocondrial e danos ao material genético do parasito. Tais ensaios sugerem que os danos causados pelos complexos sejam relacionados a produção de EROs. Além disso foi demonstrado que os complexos reduzem significativamente a infectividade do parasito. Isso demonstra que mesmo utilizando moléculas completamente diferentes, o estresse oxidativo é capaz de danificar estruturas das leishmanias, comprometendo suas atividades biológicas.

Ainda há poucos dados disponíveis na literatura que exploram os efeitos leishmanicidas das LAAOs, portanto ainda se faz necessário elucidar seus mecanismos. Parte dos efeitos tóxicos das LAAOs podem ser atribuídos a produção de peróxido de hidrogênio, capaz de causar danos reparáveis ou não a membrana plasmática, material genético, proteínas e mitocôndrias, podendo culminar em apoptose dos organismos. As diferenças entre os sistemas redox de mamíferos e tripanosomatídeos indicam bons alvos para novos fármacos que interfiram no estresse oxidativo. Dessa forma as SV-LAAOs representam uma boa ferramenta para elucidar melhor as vias, os danos causados e a resposta dos parasitos.

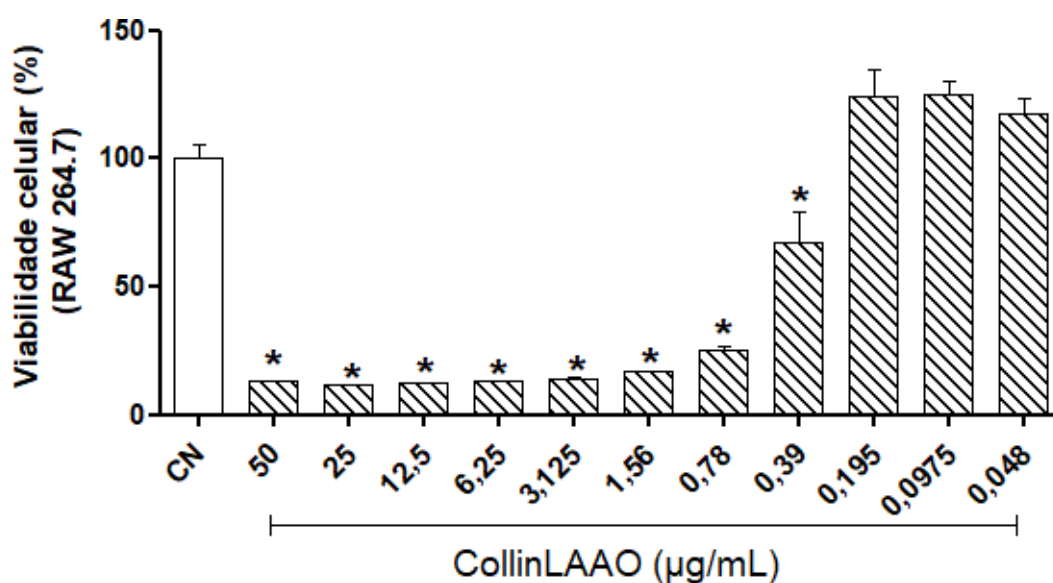


Figura 13. Viabilidade de macrófagos RAW tratados com CollinLAAO. Macrófagos foram incubados por 24h com diferentes concentrações de CollinLAAO (50 - 0,195 µg/mL). O controle negativo foi incubado apenas com PBS. Após 24h, as células foram incubadas com 5 mg/mL de MTT durante 3h. Os cristais de formazan foram dissolvidos pela adição de 100 uL de PBS contendo 10% de SDS e 0,01M de HCl. Após 18h a absorbância foi medida 570nm. Três experimentos independentes foram realizados em triplicata. $p < 0,05$ (*).

Tabela 2. Efeito da CollinLAAO sobre a infectividade de *L. (L.) infantum* em macrófago hospedeiro.

CollinLAAO (µg/mL)	Índice de infectividade**	Macrófagos infectados (%)**	Número de parasitos/macrófagos infectados**
Controle	480,22(±29,97)	97,75(±0,30)	5,07(±0,30)
0,78	353,74(±27,25)*	79,25(±2,50)	4,46(±0,30)
0,39	327,23(±16,09)*	82,50(±1,29)	3,94(±0,17)

* redução estatisticamente significativa em comparação com o controle ($p < 0,05$)

** Resultados expressos em média e desvio padrão (±SD)

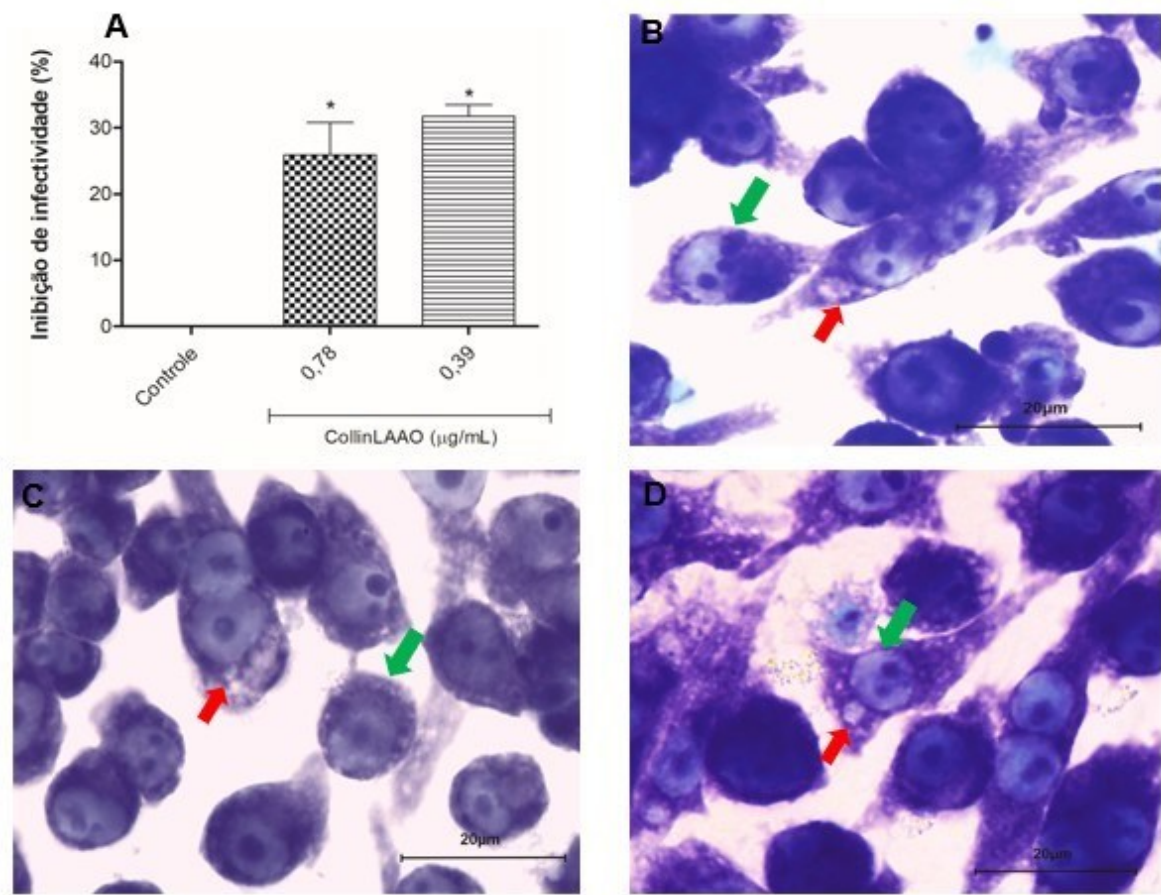


Figura 14. Efeito da CollinLAO sobre a infectividade de *L. (L.) infantum* em macrófago hospedeiro. (A) Apresenta resultados em percentual da inibição do índice de infectividade; (B) Controle, apenas macrófagos e *Leishmania*, sem tratamento com CollinLAO. A seta vermelha indica amastigotas dentro do vacúolo e a seta verde indica macrófagos. (C) Tratamento de 0,78 $\mu\text{g/mL}$ e (D) Tratamento com 0,39 $\mu\text{g/mL}$. Todas capturas de imagens foram realizadas utilizando objetiva de 100x com um aumento final de 1000x.

5.0 CONCLUSÃO

Até o presente momento, nenhuma LAAO havia sido isolada da peçonha de *C. d. collilineatus*. A CollinLAAO foi isolada com sucesso em duas etapas cromatográficas, apresentou rendimento satisfatório e um bom grau de homogeneidade. Sua caracterização enzimática diferiu-se do esperado para uma SV-LAAO, demonstrando maior resistência a baixas temperaturas e altos pHs.

A CollinLAAO apresentou citotoxicidade diferente para as três espécies de leishmania testadas, indicando diferente susceptibilidade entre as cepas, sendo *Leishmania (L.) infantum* a mais sensível. Entretanto não houve morte celular na presença de catalase, sugerindo que seus efeitos tóxicos estão relacionados ao estresse oxidativo promovido pelo peróxido de hidrogênio formado durante a catalise enzimática. Concentrações subtóxicas da CollinLAAO foram capazes de aumentar a produção intracelular de EROs, resultando provavelmente em perda de função mitocondrial e celular e consequentemente reduzindo a infectividade dos parasitos sobre macrófagos hospedeiros.

Os efeitos leishmanicidas das SV-LAAOs ainda são poucos explorados e elucidados, portanto, o presente trabalho apresenta contribuições científicas inovadoras. Entretanto novos questionamentos surgem, sendo necessários mais pesquisas e análises específicas, tanto estruturais quanto bioquímicas e farmacológicas, indicando o potencial biotecnológico dessa enzima, afim de elucidar com mais clareza seus mecanismos de atuação.

REFERÊNCIAS

- ABDELKAFI-KOUBAA, Z.; JEBALI, J.; OTHMAN, H.; MORJEN, M.; AISSA, I.; ZOUARI-KESENTINI, R.; BAZAA, A.; ELLEFI, A. A.; MAJDOUB, H.; SRAIRI-ABID, N.; GARGOURI, Y.; AYEB, M. E.; MARRAKCHI, N. A thermoactive L-amino acid oxidase from *Cerastes cerastes* snake venom: purification, biochemical and molecular characterization. **Toxicon**. v. 89, p. 32–44. 2014. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2014.06.020>
- ABIDIN, S. A. Z.; RAJADURAI, P.; CHOWDHURY, E. H.; OTHMAN, I.; NAISU, R. Cytotoxic, Anti-Proliferative and Apoptosis Activity of L-Amino Acid Oxidase from Malaysian *Cryptelytrops purpureomaculatus* (CP-LAAO) Venom on Human Colon Cancer Cells. **Molecules**, v. 23, p. 1388. 2018. <https://doi.org/10.3390/molecules23061388>
- AHN, M. Y.; LEE, B. M.; KIM, Y. S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). **The Int J Biochem & Cell Biol**. v. 29(6). p. 911-919. 1997. <https://doi.org/10.3390/molecules23061388>
- ALI, A.; HAMID, F.; ABBASI, A.; ZAIDI, Z. H.; SHEHNAZ, D. Pharmacological effects of the leaf-nosed viper snake (*Eristocophis macmahoni*) venom and its HPLC fractions. **Toxicon**, v. 37, p. 1095–1107, 1999. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(98\)00243-8](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(98)00243-8)
- AMATO, V. S.; ANDRADE, J. R.; DUARTE, M. I. S. Mucosal leishmaniasis: in situ characterization of the host inflammatory response, before and after treatment, **Acta Tropica**. v. 85(1), p. 39–49, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0001-706X\(02\)00260-7](https://doi.org/10.1016/S0001-706X(02)00260-7)
- ANDE, S. R.; FUSSI, H.; KNAUER H.; MURKOVIC, M.; GHISLA, S.; FRÖHLIC, K.; MACHEROUX, P. Induction of apoptosis in yeast by L-amino acid oxidase from the malayan pit viper *calloselasma rhodostoma*. **Yeas**. v. 25(5), p. 349-357. 2008. <https://doi.org/10.1002/yea.1592>

ALVES-PAIVA, R. M.; De FREITAS FIGUEIREDO, R.; ANTONUCCI, G. A.; PAIVA, H. H.; DE LOURDES PIRES BIANCHI, M.; RODRIGUES, K. C.; LUCARINI, R.; CAETANO, R. C.; LINHARI RODRIGUES PIETRO, R. C.; GOMES MARTINS, C. H.; DE ALBUQUERQUE, S.; SAMPAIO, S. V. Cell cycle arrest evidence, parasitocidal and bactericidal properties induced by l-amino acid oxidase from *Bothrops atrox* snake venom. **Biochimie**, v. 93. p. 941-947, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2011.01.009>

AZEVEDO-MARQUES, M. M.; HERING, S. E.; CUPO, P.; CARDOSO, J. L. C.; FRANCA, F. O. S.; WEN, F. H.; MÁLAQUE, C. M. S.; HADDAD, V. Animais Peçonhentos no Brasil. Biología, Clínica e Terapeutica dos Acidentes, **2nd edition** Sao Paulo: Sarvier, p. 108–115, 2009. <https://doi.org/10.1590/S0036-46652003000600009>

BASANO, S. A.; CAMARGO, L. M. Leishmaniose tegumentar americana: histórico, epidemiologia e perspectivas de controle. **Rev bras epidemiol**. v. 7(3), p. 328-37. 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300010>

BEIG, M.; OELLIEN, F.; KRAUTH-SIEGEL, L. R.; SELZER P. M. Screening approaches toward trypanothione reductase. **Trypanosomatid Diseases: Molecular Routes to Drug Discovery**. p. 1–21. 2013. <https://doi.org/10.1002/9783527670383.ch21>

BENDER, M.; BRUBACHER, L. *Catálisis y acción enzimática*, Reverte, Barcelona, Spain, 1st edition, 1977.

BERN, C.; MAGUIRE, J. H.; ALVAR, J. Complexities of assessing the disease burden attributable to leishmaniasis. **PLoS Negl Trop Dis**. v. 2 p. 313. 2008. <https://doi.org/10.1371/journal.pntd.0000313>

BESTEIRO, S.; WILLIAMS, R. A. M.; COOMBS, G. H.; MOTTRAM, J. C. Protein turnover and differentiation ins Leishmania. **Int J parasitol**. v. 37(10), p. 1063-1095. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijpara.2007.03.008>

BORDON, K. C. F.; WIEZEL, G. A.; CABRAL, H.; ARANTES, E. C. Bordonein-L, a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus terrificus* snake venom: isolation, preliminary characterization and enzyme stability. **J Venom Anim Toxins incl Trop Dis** v. 21. 2015. <https://doi.org/10.1186/s40409-015-0025-8>

BRADFORD, M. M. Rapid and sensitive method for the quatitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. **AnalyticalBiochemistry**, v. 72, p. 248-254, 1976. <https://doi.org/10.1006/abio.1976.9999>

^aBRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Acidentes por animais peçonhentos – serpentes. [citado 2020 ABRIL]. Disponível em: <https://www.saude.gov.br/saude-de-a-z/acidentes-por-animais-peconhentos-serpentes>

^bBRASIL, MINISTÉRIO DA SAÚDE, BRASIL. Leishmaniose visceral. [citado 2020 ABRIL]. Disponível em: <https://saude.gov.br/saude-de-a-z/leishmaniose-visceral>

BREGGE-SILVA, C.; NONATO, M. C.; ALBUQUERQUE, S.; HO, P. L.; AZEVEDO, I. L. M. J.; DINIZ, M. R. V.; LOMONTE, B.; RUCAVADO, A.; DIAZ, C.; GUTIÉRREZ, J. M.; ARANTES, E. C. Isolation and biochemical, function and structural characterization of a novel l-amino acid oxidase from *Lachesis muta* snake venom. **Toxicon**. v. 60(7), p. 1263-1276. 2012. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.08.008>

BURZA, S.; CROFT, S. L.; BOELAERT, M. Leishmaniasis. **The lancet**. v. 392, p. 951-970. 2018. [https://doi.org/10.1016/S0140-6736\(18\)31204-2](https://doi.org/10.1016/S0140-6736(18)31204-2)

CAMPBELL, J. A.; LAMAR, W. W.; BRODIE, E. D. The venomous reptiles of the Western hemisphere. Ithaca (NY) and London. **Comstock Publishing Associates**, 2004.

CASEWELL, N. R.; JACKSON, T. N. W.; LAUSTSEN, A. H.; SUNAGA, K. Causes and consequences of snake venom variation. **Trends in pharmacol.** v. 41(8), p. 570-581. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.tips.2020.05.006>

CHAN, Y. S.; CHEUNG, C. F.; XIA, L.; WONG, J. H.; NG, T. B.; CHAN, W. Y. Snake venom toxins: toxicity and medicinal applications. **Appl Microbiol Biotechnol.** v. 100(14), p. 6165-6181. 2016 <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7610-9>

CHEN, H. S.; WANG, Y. W.; HUANG, W. T.; HUANG, K. F.; TSAI, I. H. Cloning, characterization and mutagenesis of Russell's viper venom L-amino acid oxidase: insights into its catalytic mechanism, **Biochimie**, v. 94(2), p. 335–344, 2012. <https://doi.org/10.1007/s00253-016-7610-9>

CISCOTTO, P.; DE AVILA, R. A. M.; COELHO, E. A. F.; OLIVEIRA, J.; DINIZ, C. G.; FARIAS, L. M.; DE CARVALHO, M. A. R.; MARIA, W. S.; SANCHEZ, E. F.; BORGES, A.; CHAVEZ-OLORTEGUI, C. Antigenic, microbicidal and antiparasitic properties of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Toxicon**, v. 53, p. 330–341, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2008.12.004>

CISNEROS, E. Características bioquímicas de una proteína antibacteriana aislada del veneno de *Lachesis muta* "shushupe". [tesis para optar al título de profesional de biólogo]. **UNMSM**, Lima, Peru. 1996.

CLARDY, J.; WALSH, C. Lessons from natural molecules. **Nature**. v. 432(7019), p. 829-837. 2004. <https://doi.org/10.1038/nature03194>

COLOTTI, G.; BAIOTTO, P.; FIORILLO, A.; BOFFI, A.; POSER, E.; DI CHIARO, F.; ILARI, A. Structural insights into the enzymes of the trypanothione pathway: targets for antileishmaniasis drugs. **Future Medicinal Chemistry**, v. 5(15), p. 1861–1875, 2013. <https://doi.org/10.4155/fmc.13.146>

COMINI, M. A.; FLOHÉ, L. Trypanothione-based redox metabolism of Trypanosomatids. In book: **Trypanosomatid diseases**. p. 167-199. 2013. <https://doi.org/10.1002/9783527670383.ch9>

COOMBS, G. H.; TETLEY, L.; MOSS, V. A.; VICKERMAN, K. Three dimensional structure of the leishmania amastigote as revealed by computer-aided reconstruction from serial sections. **Parasitology**, v. 92(1), p. 13–23. 1986. <https://doi.org/10.1017/S0031182000063411>

COSTA, H. C.; BÉRNILS, R. S., Répteis do Brasil e suas unidades federativas: Lista de espécies. **Sociedade Brasileira de Herpetologia**. 7(1). 2018. [citado 2020 ABRIL]. Disponível em: <http://sbherpetologia.org.br/>

COSTA, M. S.; GONÇALVES, Y. G.; TEIXEIRA, S. C.; NUNES, D. C. O.; LOPES, D. S.; SILVA, C. V.; SILVA, M. S.; BORGES, B. C.; SILVA, M. J. B.; RODRIGUES, R. S.; RODRIGUES, V. M.; POELHSITZ, G. V.; YONEYAMA, K. A. G. Increased ROS generation causes apoptosis-like death: Mechanistic insights into the anti-Leishmania activity of a potent ruthenium(II) complex. **Journal of Inorganic Biochemistry**, v. 195, p. 1–12. 2019. <https://doi.org/10.1016/j.jinorgbio.2019.03.005>

COSTA, T. R.; BURIN, S. M.; MENALDO, D. L.; CASTRO, F. A.; SAMPAIO, S. V. Snake venom L-amino acid oxidase: an overview on their antitumor effects. **J Venom Anim Toxins Incl Trop Dis**. v. 20(23). 2014. <https://doi.org/10.1186/1678-9199-20-23>

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; PRINHOLATO DA SILVA, C.; SORRECHIA, R.; DE ALBUQUERQUE, S.; PIETRO, R. C.; GHISLA, S.; ANTUNES, L. M., SAMPAIO, S. V. Evaluating the microbicidal, antiparasitic and antitumor effects of CR-LAAO from Calloselasma rhodostoma venom. **International Journal of Biological Macromolecules**, v. 80, p. 489–497, set. 2015. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2015.07.004>

COSTA, T. R.; MENALDO, D. L.; ZOCCAL, K. F.; AISSA, A. F.; CASTRO, F. A.; FACCIOLI, L. H.; ANTUNES, L. M. G.; SAMPAIO, S. V. CR-LAAO, an L-amino acid oxidase from *Calloselasma rhodostoma* venom, as a potential tool for developing novel immunotherapeutic strategies against cancer. **Sci Rep**. v. 7, p. 42673. 2017. <https://doi.org/10.1038/srep42673>

COSTA, T. R.; CARONE, S. E. I.; TUCCI, L. F. F.; MENALDO, D. L.; ROSA-GARZON, N. G.; CABRAL, H.; SAMPAIO, S. V. Kinetic investigations and stability studies of two *Bothrops* L-amino acid oxidases. **Journal of Venomous Animals and Toxins including Tropical Diseases**, v. 24(1), p. 37. 2018. <https://doi.org/10.1186/s40409-018-0172-9>

CURTI, B.; RONCHI, S.; SIMONETA, P. M. D- and L- amino acid oxidases. in: **Muller, F. (ed), Biochemistry of flavoenzyme**. v. 3. CRC PRESS, Boca Raton. p. 69-94. 1992.

DATTA, K.; BABBAR, P.; SRIVASTAVA, T.; SINHA, S., Chattopadhyay, P. p53 dependent apoptosis in glioma cell lines in response to hydrogen peroxide induced oxidative stress, **Int J Biochem Cell Biol**, v. 34(2), p. 148-157. 2002. [https://doi.org/10.1016/S1357-2725\(01\)00106-6](https://doi.org/10.1016/S1357-2725(01)00106-6)

DIMITROV, G. D.; KANKONKAR, R. C. Fractionate of *Vipera russelli* venom by gel filtration-ii comparative study of yellow and white venoms of *Vipera russelli* with special reference to the local necrotizing and lethal actions. **Toxicon**, v. 5(4), p. 283-288, 1968. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(68\)90120-7](https://doi.org/10.1016/0041-0101(68)90120-7)

DIPIETRANTONIO, A. M.; HSIEH, T. C.; WU, J. M. Activation of caspase 3 in HL-60 cells exposed to hydrogen peroxide. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v. 255(2), p. 477-482, 1999. <https://doi.org/10.1006/bbrc.1999.0208>

DOS SANTOS, I. G. C.; FORTES-DIAS, C. L.; DOS SANTOS, M. C. Aplicações farmacológicas dos venenos de serpentes brasileiras enfoque para *Crotalus durissus terrificus* e *Crotalus durissus ruruima*. **Scientia Amazonia**. v. 6(1), p. 42-53. 2017.

DU, C.; FANG, M.; LI, Y.; LI, L. Smac, a mitochondrial protein that promotes cytochrome c-dependent caspase activation by eliminating IAP inhibition. **Cell**, v. 102, p. 33-42, 2000. [https://doi.org/10.1016/S0092-8674\(00\)00008-8](https://doi.org/10.1016/S0092-8674(00)00008-8)

DU, X. Y.; CLEMETSON, K. J. Snake venom L-amino acid oxidase. **Toxicon**. v. 40(6). p. 659-665. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00102-2](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00102-2)

EHARA, T.; KITAJIMA, S.; KANZAWA, N.; TAMIYA, T.; TSUCHIYA, T. Antimicrobial action of achacin is mediated by L-amino acid oxidase activity. **FEBS Lett**. v. 531(3), p. 509-512. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0014-5793\(02\)03608-6](https://doi.org/10.1016/S0014-5793(02)03608-6)

FRANÇA, S. C.; KASHIMA, S.; ROBERTO, P. G.; MARINS, M.; TICLI, F. K.; PEREIRA, J. O.; ASTOLFI-FILHO, S.; STÁBELI, R. G.; MAGRO, A. J.; FONTES, M. R. M.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M. Molecular approaches for structural characterization of *Bothrops* L-amino acid oxidase with antiprotozoal activity: cDNA cloning, comparative sequence analysis, and molecular modeling. **Biochem Biophys Res Commun**. v. 355(2), p. 302-306. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2006.12.217>

FERREIRA, C. S.; MARTINS, P. S.; DEMICHELI, C.; BROCHU, C.; OUELLETTE, M.; FREZARD, F. Thiol-induced reduction of antimony(V) into antimony(III): a comparative study with trypanothione, cysteinyl-glycine, cysteine and glutathione, **Biometals**, v. 16(3), p. 441–446. 2003. <https://doi.org/10.1023/A:1022823605068>

GIMENES, S. N. C. Caracterização bioquímica e funcional de um inibidor de Fosfolipase A2 do tipo γ isolado do soro de *Crotalus durissus collilineatus*. 96 f. Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - **Universidade Federal de Uberlândia**, Uberlândia, 2013.

GONTIJO, C. M. F.; MELO, M. N. Leishmaiose visceral no Brasil: quadro atual, desafios e perspectivas. **Rev bras epidemiol.** v. 7(3). p. 338-49. 2004. <https://doi.org/10.1590/S1415-790X2004000300011>

GOSSAGE, S. M.; ROGERS, M. E.; BATES, P. A. Two separate growth phases during the development of *Leishmania* in sand flies: implications for understanding the life cycle, **International Journal for Parasitology.** v. 33, p. 1027 – 1034, 2003. [https://doi.org/10.1016/S0020-7519\(03\)00142-5](https://doi.org/10.1016/S0020-7519(03)00142-5)

HALDAR, A. K.; SEN, P.; ROY, S. Use of antimony in the treatment of leishmaniasis: current status and future directions, **Molecular Biology International.** v. 2011(571242), p. 1-23, 2011. <https://doi.org/10.4061/2011/571242>

HARHAY, M. O.; OLLIARO, P. L.; VAILLANT, M. V.; CHAPPUIS, F.; LIMA, M. A.; RITMEIJER, K.; COSTA, C. H.; COSTA, D. L.; RIJAL, S.; BALESGARAM, M. Who is typical patient with visceral leishmaniasis? Characterizing the demographic and nutritional profile of patients in Brazil, East Africa, and South Asia. **Am. J. Trop. Med. Hyg.** v. 84(4), p. 543-550. 2011. <https://doi.org/10.4269/ajtmh.2011.10-0321>

HARVEY, A. L.; EDRADA-EBEL, R.; QUINN, R. J. The re-emergence of natural products for drugs discovery in the genomics era. **Nat Rev Drug Discov.** v. 14(2), p. 111-129. 2015. <https://doi.org/10.1038/nrd4510>

IZIDORO, L. F. M.; RIBEIRO, M. C.; SOUZA, G. R. L.; SANT'ANA, C. D.; HAMAGUCHI, A.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; GOULART, L. R.; BELEBONI, R. O.; NOMIZO, A.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Biochemical and functional characterization of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pirajai* snake venom. **Bioorg. Med. Chem.**, v. 14, p. 7034–7043, 2006. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2006.06.025>

IZIDORO, L. F.; SOBRINHO, J. C.; MENDES, M. M.; COSTA, T. R.; GRABNER, A. N.; RODRIGUES, V. M.; DA SILVA, D. L.; ZANCHI, F. B.; ZULIANI, J. P.; FERNANDES, C. F.; CALDERON, L. A.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Snake venom L-amino acid oxidases: trends in pharmacology and biochemistry. **Biomed Res.**, vol. 2014, p. 1-19, 2014. <https://doi.org/10.1155/2014/196754>

KANG, T. S.; GEORGIEVA, D.; GENOV, N.; MURAKAMI, M. T.; SINHA, M.; KUMAR, R. P.; KAUR, P.; KUMAR, S.; DEY, S.; SHARMA, S.; VRIELINK, A.; BETZEL, C.; TAKEDA, S.; ARNI, R. K.; SINGH, T. P.; KINI, R. M. Enzymatic toxins from snake venom: structural characterization and mechanism of catalysis. **FEBS Journal**. The Authors Journal compilation. v. 278(3), p. 4544–4576. 2011. <https://doi.org/10.1111/j.1742-4658.2011.08115.x>

KOK, A.; RAWITCH, A. B. Studies on L-amino acid oxidase. II. Dissociation and characterization of its subunits. **Biochemistry**, v. 8, p. 1405–1411, 1969. <https://doi.org/10.1021/bi00832a015>

KORNALIK, F.; MASTER, R. W. P. A comparative examination of yellow and white venoms of *Vipera ammodytes*. **Toxicon**, v. 2(2). p. 109-111. 1964. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(64\)90011-X](https://doi.org/10.1016/0041-0101(64)90011-X)

KRAUTH-SIEGEL, L. R.; COMINI, M. A. Redox control in Trypanosomatids, parasitic protozoa with trypanothione-based thiol metabolism. **Biochim Biophys acta**. v. 1780(11), p. 1236-1248. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2008.03.006>

KRAUTH-SIEGEL, L. R.; SCHMIDT, A. Enzymes of the trypanothione metabolism as target for antitrypanosomal drug development. **Current topics in medicinal chemistry**. v. 2(11), p. 1239-1259. 2002. <https://doi.org/10.2174/1568026023393048>

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins, during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**. v. 227, p. 680–689. 1970.
<https://doi.org/10.1038/227680a0>

LOEFFLER, M.; KROEMER, G. The Mitochondrion in Cell Death Control: Certainties and Incognita. **Experimental Cell Research**, v. 256(1), p. 19–26. 2000.
<https://doi.org/10.1006/excr.2000.4833>

LU, Q. M.; WEI, Q.; JIN, Y.; WANG, W. Y.; XIONG, Y. L. L-amino acid oxidase from *Trimeresurus jerdonii* snake venom: purification, characterization, platelet aggregation-inducing and antibacterial effects. **J Nat Toxins**. v. 11(40), p. 345-352. 2002. [https://doi.org/10.1016/S0041-0101\(02\)00141-1](https://doi.org/10.1016/S0041-0101(02)00141-1)

MACHEROUX, P.; SETH, O.; BOLLSCHWEILER, C.; SCHWARZ, M.; KURFÜRST, M.; AU, L. C.; GHISLA, S. L-amino-acid oxidase from the Malayan pit viper *Calloselasma rhodostoma*: comparative sequence analysis and characterization of active and inactive forms of the enzyme, **European Journal of Biochemistry**. v. 268(6), p. 1679–1686, 2001. <https://doi.org/10.1046/j.1432-1327.2001.02042.x>

MACKESSY, S. P. Fractionate of Red Diamond Rattlesnake (*Crotalus ruber ruber*) Venom: protease, phosphodiesterase, L-amino acid oxidase activities and effects of metal ions and inhibitors on protease activity. **Toxicon**. v. 23(2), p. 337-340. 1985. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(85\)90157-6](https://doi.org/10.1016/0041-0101(85)90157-6)

MANNERVICK, B.; BOGARRAM, V.; CARLBERG, I. The catalytic mechanism of mechanism of glutathione reductase-flavin and flavoproteins. **Scientific societies press, tokyo**, 1st ed. v. 258(3), p. 1752-7. 1980.

MASSEY, V.; CURTI B. On the reaction mechanism of *Crotalus adamanteus* L-amino acid oxidase. **J Biol Chem**. v.242, p. 1259-1264. 1967.
[https://doi.org/10.1016/S0021-9258\(18\)96172-7](https://doi.org/10.1016/S0021-9258(18)96172-7)

MATSUMOTO, H.; HANIU, H.; KOMORI N. Determination of Protein Molecular Weights on SDS-PAGE, *Methods Mol Biol.* v. 1855: p. 101-105. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-8793-1_10

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: Application to proliferation and cytotoxicity assays. *J. Immunol. Meth.*, v. 65, p. 55-63, 1983. [https://doi.org/10.1016/0022-1759\(83\)90303-4](https://doi.org/10.1016/0022-1759(83)90303-4)

MOUSTAFA, I. M.; FOSTER, S. F.; LYUBIMOV, A. Y.; VRIELINK, A. Crystal Structure of LAAO from *Calloselasma Rhodostoma* with an L-phenylalanine substrate: insights into structure and mechanism. *J Mol Biol.* v. 364(5), p. 991-1002. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.jmb.2006.09.032>

NAGLE, A. S.; KHARE, S.; KUMAR, A. B.; SUPEK, F.; BUCHYNSKYY, A.; MATHISON, C. J. N.; CHENNAMANENI, N. K.; PENDEM, N.; BUCKNER, F. S.; GELB, M. H.; MOLTENI, V. Recent developments in drug discovery for Leishmaniasis and Human African Trypanosomiasis, *Chemical reviews*, v. 114, p. 11305 – 11347. 2014. <https://doi.org/10.1021/cr500365f>

NATHAN, I.; DVILANSKY, A.; YIRMIYAHU, T.; AHARON, M.; LIVNE, A. Impairment of platelet aggregation by *Echis colorata* venom mediated by L-amino acid oxidase or H₂O₂. *Thromb Haemost.* v. 48(3), p. 277-82. 1982. <https://doi.org/10.1055/s-0038-1657280>

NAUMANN, G. B.; SILVA, L. F.; SILVA, L.; FARIA, G.; RICHARDSON, M.; EVANGELISTA, K.; KOHLHOFF, M.; GONTIJO, C. M. F.; NAVDAEV, A.; REZENDE, F. F.; JOHANNES, A. E.; SANCHEZ, E. F. Cytotoxicity and inhibition of platelet aggregation caused by an L-amino acid oxidase from *Bothrops leucurus* venom, *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1810(7), p. 683–694, 2011. <https://doi.org/10.1016/j.bbagen.2011.04.003>

NEVES, D. P. Parasitologia humana, 13^a ed. São Paulo: **Editora Atheneu**, 2016.

NISHIZAWA, T.; ALDRICH, C. C.; SHERMAN, D. H. Molecular analysis of the rebeccamycin L-amino acid oxidase from *Lechevalieria aerocolonigenes* ATCC 39243. **J Bacteriol.** v. 87(6), p. 2084-2092. 2005. <https://doi.org/10.1128/JB.187.6.2084-2092.2005>

NUUTINEN, J. T.; TIMONEN, S. Identification of nitrogen mineralization enzymes, l-amino acid oxidase, from ectomycorrhizal fungi *Hebeloma* spp. and *Laccaria bicolor*. **Mycol Res.** v. 112(12). p. 1453-1464. 2008. <https://doi.org/10.1016/j.mycres.2008.06.023>

OLIVEIRA, I. S.; CARDOSO, I. A.; BORDON, K. C. F.; CARONE, S. E. I.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; PUCCA, M. B.; ZOCCAL, K. F.; FACCIOLI, L. H.; SAMPAIO, S. V.; ROSA, J. C.; ARANTES, E. C. Global proteomic and functional analysis of *Crotalus durissus collilineatus* individual venom variation and its impact on envenoming. **J Proteomics.** v. 16(191). p. 153-165. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.jprot.2018.02.020>

PAIK, W. K.; KIM, S. pH-substrate relationship of l-amino acid oxidase from snake venom and rat kidney. **Biochimica and biophysica acta.** v. 90(1), p. 66-74. 1965. [https://doi.org/10.1016/0005-2787\(65\)90610-6](https://doi.org/10.1016/0005-2787(65)90610-6)

PALLEPATI, P.; AVERILL-BATES, D. Mild thermotolerance induced at 40 degrees C increases antioxidants and protects HeLa cells against mitochondrial apoptosis induced by hydrogen peroxide: Role of p53, **Arch Biochem Biophys.** v. 495, p. 97-111. 2010. <https://doi.org/10.1016/j.abb.2009.12.014>

PALMEIRO, M. R.; MORGADO, F. N.; VALETE ROSALINO, C. M.; MARTINS, A. C.; MOREIRA, J.; QUINTELLA, L. P.; DE OLIVEIRA SCHUBACH, A.; CONCEIÇÃO-SILVA, F. Comparative study of the in situ immune response in oral and nasal mucosal leishmaniasis, **Parasite Immunology.** v. 34(1), p. 23–31, 2012. <https://doi.org/10.1111/j.1365-3024.2011.01343.x>

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I. D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 47(1), p. 24-29, 2001. <https://doi.org/10.1590/S0104-42302001000100026>

RAMOS, O. H. P.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; Snake venom metalloproteases — structure and function of catalytic and disintegrin domains. **Comparative Biochemistry and Physiology**, Part C. v. 14,. p. 328–346. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.cbpc.2005.11.005>

REDZA-DUTORDOIR, M.; AVERILL-BATES, D.; A. Activation of apoptosis signalling pathways by reactive oxygen species. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Molecular Cell Research**. V. 1863(12), P. 2977-2992. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.bbamcr.2016.09.012>

RODRIGUES, R. S.; DA SILVA, J. F.; BOLDRINI-FRANÇA, J.; FONSECA, F. P.; OTAVIANO, A. R.; HENRIQUE-SILVA, F.; HAMAGUCHI, A.; MAGRO, A. J.; BRAZ, A. S.; DOS SANTOS, J. I.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; FONTES, M. R.; FULY, A. L.; SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M. Structural and functional properties of Bp-LAAO, a new L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops pauloensis* snake venom. **Biochimie**, v. 91, p. 490-501, 2009. <https://doi.org/10.1016/j.biochi.2008.12.004>

RODRIGUES, V. M.; LOPES, D. S.; CASTANHEIRA, L. E.; GIMENES, S. N.; NAVES DE SOUZA, D. L.; ACHE, D. C.; BORGES, I. P.; YONEYAMA, K. A.; RODRIGUES, R. S. *Bothrops pauloensis* snake venom toxins: the search for new therapeutic models. **Current Topics in Medicinal Chemistry**. v. 15(7), p. 670-684, 2015. <https://doi.org/10.2174/1568026615666150217120347>

SACKS, D.; NOBEN-TRAUTH, N. The immunology of susceptibility and resistance to *Leishmania major* in mice. **Nature Reviews Immunology**. v. 2(11), p. 845 – 858, 2002. <https://doi.org/10.1038/nri933>

SALAMA, W. H.; IBRAHIM, N. M. E. L.; HAKIM, A. E.; BASSUINY, R. I.; MOHAMED, M. M.; MOUSA, F. M.; ALI, M. M. L-amino acid oxidase from *Cerastes vipera* snake venom: isolation, characterization and biological effects on bacteria and tumor cell lines. **Toxicon**. v. 150, p. 270–9. 2018. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2018.06.064>

SAMEL, M.; TÖNISMÄGI, K.; RÖNNHOLM, G.; VIJA, H.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Naja naja oxinana* venom. **Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.**, v. 149, p. 572-580, 2008. <https://doi.org/10.1016/j.cbpb.2007.11.008>

SANT'ANA, C. D.; MENALDO, D. L.; COSTA, T. R.; GODOY, H.; MULLER, V. D. M.; AQUINO, V. H.; SAMPAIO, S. V.; MONTEIRO, M. C.; STÁBELI, R. G.; SOARES, A. M. Antiviral and antiparasite properties of an L-amino acid oxidase from the snake *Bothrops jararaca*: cloning and identification of a complete cDNA sequence. **Biochem Pharmacol.** v. 76(2), p. 279-288. 2008 <https://doi.org/10.1016/j.bcp.2008.05.003>

SANTOS, M. M. de V.; SANT'ANA, C. D.; GIGLIO, J. R.; SILVA, R. J.; SAMPAIO, S. V.; SOARES, A. M.; FECCHIO, D. Antitumoural effect of an L-amino acid oxidase isolated from *Bothrops jararaca* snake venom. **Basic and Clinical Pharmacology and Toxicology**, v. 102(6), p. 533–542, 2008. <https://doi.org/10.1111/j.1742-7843.2008.00229.x>

SCHENBERG, S. Geographical pattern of crotonine distribution in the same rattlesnake subspecies. **Science (New York, NY)**. v. 129(3359), p. 1361-1363. 1959. <https://doi.org/10.1126/science.129.3359.1361>

SILVA, S. S.; MIRANDA, M. M.; COSTA, I. N.; WATANABE, M. A. E.; PAVANELLI, W. R.; FELIPE, I.; SFORCIN, J. M.; CONCHON-COSTA, I. Leishmanicidal activity of brazilian propolis hydroalcoholic extract in *Leishmania amazonensis*. **Semana: Ciências Biológicas e da Saúde**. v. 36(2), p. 35-44. 2015 <https://doi.org/10.5433/1679-0367.2015v36n2p25>

SKARNES, R. C. L-amino acid Oxidase, a bactericidal system. **Nature**. v. 225(5237), p. 1072-1073. 1970. <https://doi.org/10.1038/2251072a0>

SKRABA, C. M.; PEDROSO, R. B.; FIORINI, A.; ROSADO, F. R.; ARISTIDES, S. M.; LONARDONI, M. V.; TEIXEIRA, J. J.; SILVEIRA, T. G. Diagnosis of American cutaneous leishmaniasis by enzyme immunoassay using membrane antigens of *Leishmania (Viannia) braziliensis*, **Diagnostic Microbiology and Infectious Disease**, v. 78(4), p. 411-417, 2014. <https://doi.org/10.1016/j.diagmicrobio.2013.08.020>

SOARES, T. G.; DOS SANTOS, J. L.; ALVARENGA, V. G.; SANTOS, J. S. C.; LECLERCQ, S. Y.; FARIA, C. D.; OLIVEIRA, M. A. A.; BEMQUERER, M. P.; SANCHEZ, E. O. F.; LIMA, M. E.; FIGUEIREDO, S. G.; BORGES, M. H. Biochemical and functional properties of a new L-amino acid oxidase (LAAO) from *Micrurus lemniscatus* snake venom. **Int J Biol Macromol**. v. 154(1) 1517-1527. 2020. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2019.11.033>

SOLIS, C. C.; ESCOBAR, E.; YARLEQUÉ, A.; GUTIÉRREZ, S. Purificación y caracterización de la L-aminoácido oxidasa del veneno de la serpiente *Bothrops brazili*. **Revista peruana de Biología**. v. 6, p. 75-84. 1999. <https://doi.org/10.15381/rpb.v6i1.8302>

STÁBELI, R. G.; MARCUSSI, S.; CARLOS, G. B.; PIETRO, R. C. L. R.; SELISTRE-DE-ARAUJO, H. S.; GIGLIO, J. R.; OLIVEIRA, E. B.; SOARES, A. M. Platelet aggregation and antibacterial effects of an L-amino acid oxidase purified from *Bothrops alternatus* snake venom. **Bioorg Med Chem**. v. 12(11), p. 2881-2886. 2004. <https://doi.org/10.1016/j.bmc.2004.03.049>

STÁBELI R. G.; SANT'ANA C. D.; RIBEIRO P. H.; COSTA T. R.; TICLI F. K.; PIRES M. G.; NOMIZO A.; ALBUQUERQUE S.; MALTA-NETO N. R.; MARINS M.; SAMPAIO S. V.; SOARES A. M. Cytotoxic L-amino acid oxidase from *Bothrops moojeni*: biochemical and functional characterization. **Int. J. Biol. Macromol.**, v. 41, p. 132-40, 2007. <https://doi.org/10.1016/j.ijbiomac.2007.01.006>

STILES B. G.; SEXTON, F. W.; WEINSTEIN S. A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins from *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**. v. 29(9), p. 1129–1141. 1991. [https://doi.org/10.1016/0041-0101\(91\)90210-I](https://doi.org/10.1016/0041-0101(91)90210-I)

SUHARA, T.; FUKUO, K.; SUGIMOTO, T.; MORIMOTO, S.; NAKAHASHI, T.; HATA, S.; SHIMIZU, M.; OGIHARA, T. Hydrogen peroxide induces up-regulation of Fas in human endothelial cells, **Journal of Immunology**, v. 160(8), p. 4042–4047, 1998. <https://doi.org/10.4049/jimmunol.160.8.4042>

TEIXEIRA, T. L.; OLIVEIRA SILVA, V. A.; DA CUNHA, D. B.; POLETTINI, F. L.; THOMAZ, C. D.; PIANCA, A. A.; ZAMBOM, F. L.; DA SILVA LEITÃO MAZZI, D. P.; REIS, R. M.; MAZZI, M. V., Isolation, characterization and screening of the in vitro cytotoxic activity of a novel L-amino acid oxidase (LAAOcdt) from *Crotalus durissus terrificus* venom on human cancer cell lines. **Toxicon**, v. 119, p. 203–217. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2016.06.009>

TIUMAN, T. S.; SANTOS, A. O.; UEDA-NAKAMURA, T.; FILHO, B. P. D.; NAKAMURA, C. V. Recent advances in leishmaniasis treatment. **Int J Infect Dis**. v. 15(8), p. 525-532. 2011. <https://doi.org/10.1016/j.ijid.2011.03.021>

TÕNISMÄGI, K.; SAMEL, M.; TRUMMAL, K.; RÖNNHOLM, G.; SIIGUR, J.; KALKKINEN, N.; SIIGUR, E. L-amino acid oxidase from *Vipera lebetina* venom: isolation, characterization, effects on platelets and bacteria. **Toxicon**. v. 48(2), p. 227-237. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2006.05.004>

TOYAMA, M. H.; TOYAMA, D. O.; PASSERO, L. F. D.; LAURENTI, M. D.; CORBETT, C. E.; TOMOKANE, T. Y.; FONSECA, F. V.; ANTUNES, E.; JOAZEIRO, P. P.; BERIAM, L. O. S.; MARTINS, M. A. C.; MONTEIRO, H. S. A.; FONTELES, M. C. Isolation of a new L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cascavella* venom. **Toxicon**. v. 41(1), p. 47-57. 2006. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2005.09.008>

TU, A. T. Chemistry of rattlesnake venoms. In: (Ed). **Rattlesnakes venoms: their action and treatment**. New York: Marcel dekker, Inc. p. 247-312. 1982.

ULLAH, A. Structure–Function Studies and Mechanism of Action of Snake Venom L-Amino Acid Oxidases. **Front Pharmacol**. v. 11, p. 110. 2020. <https://doi.org/10.3389/fphar.2020.00110>

VARGAS, L. J.; QUINTANA, J. C.; PEREAÑEZ, J. A.; NÚÑEZ, V.; SANZ, L.; CALVETE, J. Cloning and characterization of an antibacterial L-amino acid oxidase from *Crotalus durissus cumanensis* venom. **Toxicon**, v. 64, p. 1–11, 2013. <https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2012.11.027>

VILAMENA, F. A. Reactive species detection in biology. In: Fluorescence to electron paramagnetic resonance spectroscopy. p. 87-162. 2017. <https://doi.org/10.1016/B978-0-12-420017-3.00003-7>

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Neglected tropical diseases. [citado 2020 ABRIL]. Disponível em: https://www.who.int/neglected_diseases/diseases/en/

WÜSTER W.; FERGUSON, J. E.; QUIJADA-MASCAREÑAS, J. A.; POOK, C. E.; SALOMÃO, M. G.; THORPE, R. S. Tracing an invasion: landbridges, refugia and the phylogeography of the Neotropical rattlesnake (Serpentes: Viperidae, *Crotalus durissus*). **Mol. Ecol**. v. 14, p. 1095–108, 2005. <https://doi.org/10.1111/j.1365-294X.2005.02471.x>

YOSHIDA, K.; MIKI, Y. The cell death machinery governed by the p53 tumor suppressor in response to DNA damage, **Cancer Sci**, v. 101. p. 831-835. 2010. <https://doi.org/10.1111/j.1349-7006.2009.01488.x>

YU, J.; ZHANG, L. PUMA, a potent killer with or without p53. **Oncog**, 27 Suppl 1, p. 71-83. 2008. <https://doi.org/10.1038/onc.2009.45>

ZAMBELLI, V. O., PASQUALOTO, K. F. M., PICOLO, G., CHUDZINSKI-TAVASSI, A. M., CURY, Y. Harnessing the knowledge of animal toxins to generate drugs. **Pharmacol Res.** v. 112, p. 112-30. 2016. <https://doi.org/10.1016/j.phrs.2016.01.009>

ZIJLSTRA, E. E.; MUSA, A. M.; KHALIL, E. A. G.; EL HASSAN, I. M. E.; EL-HASSAN, A. M. Post-kala-azar dermal leishmaniasis. **The lancet**. v. 3(2), p. 87-98. 2003. [https://doi.org/10.1016/S1473-3099\(03\)00517-6](https://doi.org/10.1016/S1473-3099(03)00517-6)

ZHANG, H.; TENG, M.; NIU, L.; WANG, Y.; WANG, Y.; LIU, Q.; HUANG, Q.; HAO, Q.; DONG, Y.; LIU, P. Purification, partial characterization, crystallization and structural determinations of AHP-LAAO, a novel L-amino acid oxidase with cell apoptosis-inducing activity from *Agkistrodon halys pallas* venom. **Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.** v. 60(5). p. 974-979. 2004. <https://doi.org/10.1107/S0907444904000046>

ZHANG, L.; WEI, L. J. ACTX-8, a cytotoxic L-amino acid oxidase isolated from *Agkistrodon Acutus* snake venom, induces apoptosis in Hela cervical cancer cells. **Life Sci.** v. 80(13), p. 1189-97. 2007. <https://doi.org/10.1016/j.lfs.2006.12.024>

ZHANG, Y. J.; WANG, J. H.; LEE, W. H.; WANG, Q.; LIU, H.; ZHENG. Y. T.; ZHANG, Y. Molecular characterization of *Trimeresurus stejnegeri* venom L-amino acid oxidase with potential anti-HIV activity. **Biochem Biophys Res Commun.** v. 309(3), p. 598-604. 2003. <https://doi.org/10.1016/j.bbrc.2003.08.044>

ZHONG, S.; JIN, Y.; WU, J.; JIA, Y. H.; XU, G.; WANG, G.; XIONG, Y.; LU, Q.
Purification and characterization of a new L-amino acid oxidase from *Daboia russelli*
siamensis venom. **Toxicon**. v. 5496, p. 763-71. 2009.
<https://doi.org/10.1016/j.toxicon.2009.06.004>