



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**AÇÃO DO VENENO DE *BOTHROPS MOOJENI* E SUA
FRAÇÃO L-AMINOÁCIDO OXIDASE, SUBMETIDA AO
TRATAMENTO COM RAIOS GAMA DE ^{60}CO , EM
*LEISHMANIA SPP***

ANDRÉ GUSTAVO TEMPONE CARDOSO

Dissertação apresentada como parte
dos requisitos para obtenção do Grau
de Mestre em Ciências na Área de
Tecnologia Nuclear - Aplicações

Orientadora:
Dra. Nanci do Nascimento

**São Paulo
1999**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

AÇÃO DO VENENO DE *BOTHROPS MOOJENI* E SUA FRAÇÃO L-AMINOÁCIDO OXIDASE, SUBMETIDA AO TRATAMENTO COM RAIOS GAMA DE ^{60}CO , EM *LEISHMANIA SPP.*

André Gustavo Tempone Cardoso

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para obtenção do grau de Mestre em Ciências na Área de Tecnologia Nuclear.

Orientador:

Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo

1999



Dedico este trabalho aos meus pais Almir e Sulimar.



**“A vida responde sempre às nossas indagações.
Estudos e pesquisas são problemas de longo alcance que o Espírito
formula à frente do Universo; invenções e descobertas constituem
soluções que a Divina Sabedoria nos fornece pela escola do trabalho.”**

EMMANUEL

(psicografia de Francisco Cândido Xavier)

AGRADECIMENTOS

A DEUS, pela oportunidade da vida.

À Dra. Nanci do Nascimento, minha orientadora, pela confiança, apoio e amizade.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior, meu co-orientador, por me acolher em seu laboratório e por todo apoio científico e amizade.

Ao Dr. José R. Rogero, pela orientação na fase inicial do trabalho.

À Dra. Sílvia C. Alfieri, pela colaboração e sugestões no trabalho.

À Dra. Maria Aparecida, pelas discussões científicas sobre venenos.

Ao amigo Dr. Bruno A. Cardi, pelas proveitosas discussões científicas e companheirismo.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Ao Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.

Ao Instituto de Medicina Tropical de São Paulo.

À Cleuza Takakura, pelas belíssimas microscopias eletrônicas.

Ao amigo Patrick Jack Spencer, pelos ensinamentos científicos, incentivo e amizade.

Ao amigo João (TBM) pelo incentivo e companheirismo.

Ao amigo Paulo A. Paes, pela amizade e por me aguentar na sala!

Aos colegas do TBM, pelo incentivo.

Às amigas Helena e Malvina, pelas sugestões e companheirismo.

À amiga Miriam Suzuki, pelo carinho.

Ao amigo Roberto Hiramoto, pelo companheirismo.

Aos amigos do IMT, pelo companheirismo e, especialmente à Rose e Bel, pelo auxílio nas culturas celulares.

À amiga Cecília, pela amizade.

À amiga Débora (IMT), por muito me ensinar na parte de cultura celular e pela amizade.

À amiga Angélica (IMT), pela amizade.

A todos amigos que me auxiliaram neste trabalho e que porventura tenha me esquecido no momento.

Aos meus amados pais Almir e Sulimar, por todo incentivo em minha vida profissional, carinho, amizade; e aos quais pretendo honrar com meu trabalho nesta vida.

À minha irmã Valéria, pelo incentivo e amor, que sempre me motivou em minha carreira científica.

Ao amigo Paulo Penna, pelo companheirismo.

Ao Felipe Penna, pela alegria trazida com sua vinda.

À minha avó Carmen, pelas pitadas de carinho e amor que depositava em cada almoço dos dias que ficava aqui pela USP.

À minha namorada e amiga Anete, motivo para mim de força e trabalho, pelo carinho, amor, colo e, finalmente, pelo incentivo em todos esses anos de vida acadêmica.

À meu padrinho Jorge das Neves Ferreira, pelo amor, carinho e exemplo de vida que deixou para mim.

SUMÁRIO

	Pág.
1 INTRODUÇÃO.....	1
1.1.0 A Leishmaniose.....	1
1.1.1 Manifestações Clínicas.....	4
1.1.2 Terapia.....	7
1.2 O Veneno Botrópico.....	9
1.3 Radiação Ionizante.....	14
2- OBJETIVOS.....	18
3- MATERIAL E MÉTODOS.....	19
3.1- Cultivo de Promastigotas e Amastigotas.....	19
3.2- Ensaio de Viabilidade Celular- MTT.....	19
3.3- Determinação da Atividade Antileishmania	20
3.4- Purificações.....	21
3.4.1- Purificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Exclusão Molecular.....	21

3.4.2- Repurificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Troca Iônica.....	21
3.5- Determinação da Atividade L-aminoácido Oxidase (LAO).....	22
3.5.1 Frações Cromatográficas.....	22
3.5.2- Determinação da Atividade LAO e Atividade Específica.....	23
3.6- Isofocalização Elétrica (IEF).....	23
3.7- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	24
3.8- Análise da LAO em HPLC	24
3.9- Irradiação da Fração Purificada.....	25
3.10- Determinação da Concentração Efetiva 50% (C.E. ₅₀) da LAO.....	25
3.11- Estudo do Mecanismo de Ação da LAO Sobre as Promastigotas.....	27
3.12 Estudos Ultraestruturais.....	27
3.13- Ensaio de Toxicidade da LAO em Células LLCMK-2.....	28
4-RESULTADOS.....	29
4.1- Purificações.....	29
4.1.1- Purificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Exclusão..	29
4.1.2- Repurificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Troca Iônica.....	30
4.2- Isofocalização Elétrica (IEF).....	32
4.3- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE).....	33
4.4- Análise da LAO em HPLC.....	34
4.5- Atividade L-aminoácido oxidase (LAO).....	37
4.6- Determinação da Concentração Efetiva 50% (C.E. ₅₀) da LAO.....	39

4.7-Estudos do Mecanismo de Ação da LAO Sobre as Promastigotas.....	43
4.8 Estudos Ultraestruturais	45
4.9-Ensaio da Toxicidade da L-aminoácido oxidase.....	47
5-DISSCUSSÃO.....	48
6- CONCLUSÕES.....	55
7-REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	56

ABREVIATURAS

SDS-PAGE- Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis

CE 50%- Concentração efetiva do determinado composto que mata 50% dos parasitas testados.

DO- Densidade Óptica

FPLC- Fluid Pressure Liquid Chromatography

HBSS- Hanks Balanced Salt Solution

HPLC- High Performance Liquid Chromatography

IEF- Isoelectric Focusing

LAO- L-aminoácido Oxidase

LC- Leishmaniose cutânea

LCD- Leishmaniose Cutânea Difusa

LMC- Leishmaniose mucocutânea

LV- Leishmaniose visceral

MM- Massa Molecular

MTT- (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide)

pI- Ponto isoelétrico

SC- Sistema Complemento

Ação do veneno de *Bothrops moojeni* e sua fração L-aminoácido oxidase, submetida ao tratamento com raios gama de ⁶⁰Co, em *Leishmania spp.*

André Gustavo Tempone Cardoso

RESUMO

O veneno de *Bothrops moojeni* apresentou uma atividade antileishmania *in vitro*, como observado pelo método de viabilidade celular utilizando a redução do MTT. Após a purificação do veneno, através de técnicas cromatográficas, observou-se que as frações que continham as atividades antileishmania e L-aminoácido oxidase, eluíram nas mesmas posições. A massa molecular da enzima foi estimada em 140kDa, por cromatografia de exclusão molecular e, 69kDa, por SDS-PAGE, migrando como uma banda única, com ponto isoelétrico de 4.8, como determinado por isofocalização elétrica. A LAO do veneno de *B.moojeni*, com uma atividade enzimática 135 vezes maior que o veneno total, apresentou uma constituição homodimérica, sendo ativa contra *Leishmania spp* do Novo Mundo, com uma concentração efetiva contra *L (L.) amazonensis* de 1,80µg/ml, *L.(V.) panamensis* (0,78µg/ml) e *L.(L.) chagasi* (0,63µg/ml). Estudos ultraestruturais de promastigotas afetadas pela ação da LAO, indicaram morte celular, com edema em várias organelas como mitocôndrias e membrana nuclear, antes de ocorrer a ruptura da célula e necrose. A ação da LAO demonstrou ser peróxido de hidrogênio-dependente. Estudos com células LLCMK-2, tratadas com a LAO, apresentaram um efeito tóxico nas mesmas, com uma CE₅₀ de 11µg/ml. A irradiação da LAO com raios gama de ⁶⁰Co, não afetou por completo sua atividade oxidativa, nem mesmo destoxicou a enzima. Amastigotas tratadas com a LAO, não foram afetadas pelo peróxido de hidrogênio produzido, por outro lado o mesmo produto, de origem exógena, matou as amastigotas com uma CE₅₀ de 0,67mM. Este conjunto de dados poderia ser de interesse no desenvolvimento de terapias alternativas para o tratamento da Leishmaniose.

**Action of *Bothrops moojeni* venom and its L-amino acid oxidase fraction,
treated with ⁶⁰Co gamma rays, in *Leishmania spp.***

André Gustavo Tempone Cardoso

ABSTRACT

Bothrops moojeni venom showed an antileishmania activity *in vitro*, as determined by a cell viability assay using the reduction of MTT. After venom purification, by chromatography techniques, the fractions with antileishmania and L-amino acid oxidase activities, eluted in the same positions. The molecular weight of the enzyme was estimated to be 140 kDa by molecular exclusion chromatography, and 69 kDa, by SDS-PAGE, migrating as a single band, with an isoelectric point of 4.8 as determined by isoelectric focusing. The purified LAO from *B. moojeni* venom, 135-fold more active than crude venom, showed homodimeric constitution, and was active against *Leishmania spp* from the New World, with an effective concentration against *L.(L). amazonensis* of 1.80 µg/ml (EC₅₀), *L.(V.) panamensis* (0.78 µg/ml) and *L.(L.) chagasi* (0.63 µg/ml). Ultrastructural studies of promastigotes affected by LAO demonstrated cell death, with edema in several organelles such as mitochondria and nuclear membrane, before cell disruption and necrosis. The action of LAO was demonstrated to be hydrogen peroxide-dependent. Studies with LLCMK-2 cells, treated with LAO, showed a toxic effect, with an EC₅₀ of 11µg/ml. Irradiation of LAO with ⁶⁰Co gamma rays, did not affect its whole oxidative activity, neither detoxified the enzyme. Amastigotes treated with LAO were not affected by its hydrogen peroxide, otherwise, the exogenous product, killed amastigotes with an EC₅₀ of 0.67mM. These data could be of help in the development of alternative therapeutic approaches to the treatment of leishmaniasis.

1- INTRODUÇÃO

1.1.0 A Leishmaniose

A Leishmaniose foi identificada no primeiro século da era cristã na Ásia Central e inclui um espectro de doenças de variados graus de severidade, que pode ocasionar desde uma lesão cutânea, de cura espontânea, a uma progressiva infecção visceral fatal (PAUL *et al*, 1997; LOUZIR *et al*, 1998).

A doença é causada por um protozoário da família *Trypanosomatidae* e gênero *Leishmania*, que se distribui amplamente na Ásia, África, Europa e América (PETERS & KILLICK-KENDRICK, 1987). É transmitida através de insetos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (ALEXANDER & RUSSELL, 1985), os quais inoculam as formas promastigotas infectantes do parasita durante o repasto sangüíneo.

O parasita possui basicamente dois tipos de ciclo: um no hospedeiro invertebrado, na forma promastigota (flagelar), e outro no vertebrado, como amastigota. A forma intracelular, é encontrada dentro dos fagolisossomas em macrófagos, conforme descrito na Fig.1.

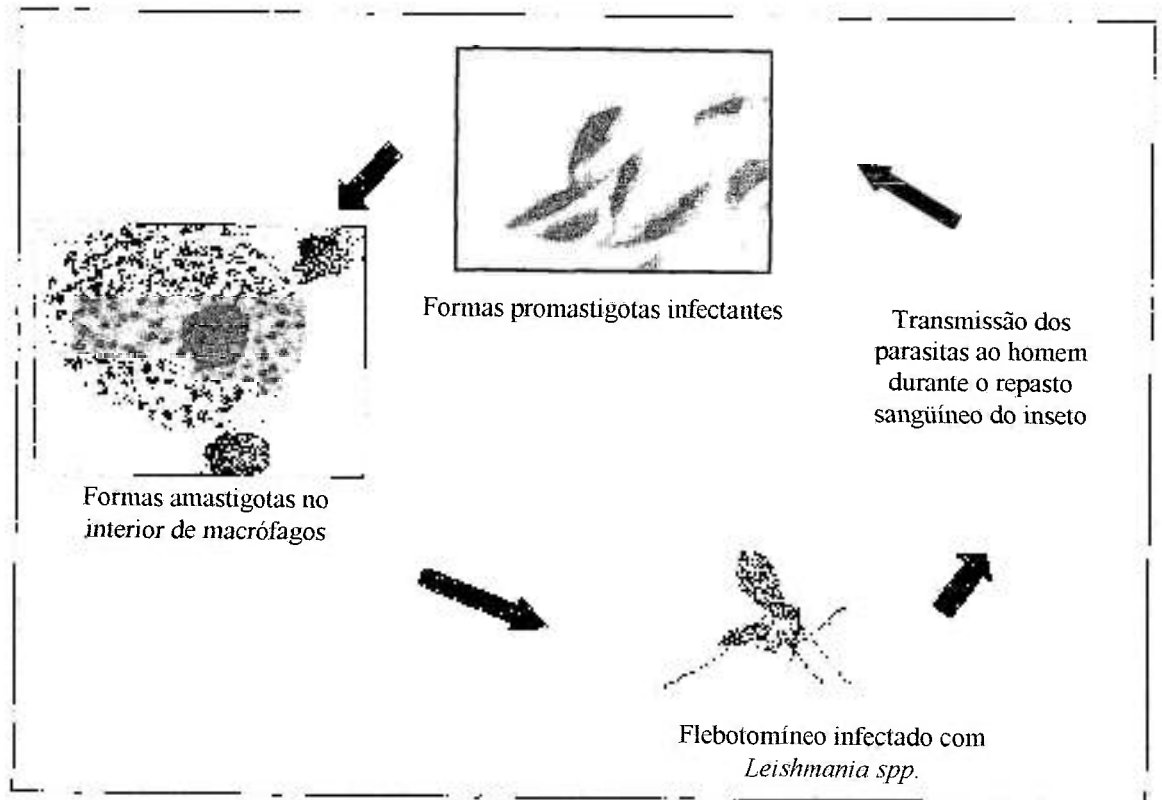


Fig.1 Ciclo da *Leishmania* spp.

A *Leishmania* é classificada de acordo com a doença que desenvolve e a distribuição geográfica (PETERS, 1987) na qual esta ocorre (Tab.1).

Subgênero	Complexo	Distribuição
<i>Leishmania (Leishmania)</i>	<i>Leishmania (Leishmania) donovani</i>	
	<i>L.(L.) donovani</i>	Velho Mundo
	<i>L.(L.) infantum</i>	Velho Mundo
	<i>L.(L.) chagasi</i>	Novo Mundo
	<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	
	<i>L.(L.) mexicana</i>	Novo Mundo
	<i>L.(L.) enriettii</i>	Novo Mundo
	<i>L.(L.) amazonensis</i>	Novo Mundo
	<i>L.(L.) aristidesi</i>	Novo Mundo
<i>Leishmania (Viannia)</i>	<i>Leishmania (Leishmania) mexicana</i>	
	<i>L.(V.) brasiliensis</i>	Novo Mundo
	<i>L.(V.) guyanensis</i>	Novo Mundo
	<i>L.(V.) panamensis</i>	Novo Mundo
	<i>L.(V.) peruviana</i>	Novo Mundo

Tab.1 Principais espécies de *Leishmania* causadoras de doenças no homem.

Esta doença afeta atualmente 12 milhões de pessoas no mundo, com mais de 400 mil novos casos por ano. É responsável pela elevada morbidade e mortalidade em vários países (SERENO & LEMESRE, 1997). No Brasil, existem cerca de 26.000 novos casos por ano (ARAÚJO, 1993), sendo o subgênero *Leishmania (Leishmania)* o responsável pela maioria destes.

A leishmaniose visceral ou kala-azar afeta grandes contingentes populacionais no Mundo, como na Índia, África e no Brasil. Na região do Mediterrâneo, apesar de seu desenvolvimento, estes agentes afetam comunidades pobres na França, Itália, Portugal e Espanha, causando a doença visceral em crianças ou em indivíduos imunocomprometidos. Devido a esses fatores, a Organização Mundial de Saúde resolveu incluir a Leishmaniose, dentre as seis endemias de maior importância de seu programa de pesquisa (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998).

1.1.1 Manifestações Clínicas

As manifestações clínicas da Leishmaniose são resultado de complexas interações entre o parasita e o sistema imunológico do hospedeiro. Apesar das formas amastigotas se apresentarem morfológicamente iguais, a doença apresenta grandes variações (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994) como descritas a seguir:

Leishmaniose Cutânea: pode ocasionar lesões do tipo pápula eritematosa na região infectada pelo inseto. O período de incubação pode variar de 1-2 semanas ou até 1-2 meses. A lesão pode ser prurídica e não provocar dor. A forma nodular

ou papular, caracteriza-se histologicamente, por denso infiltrado inflamatório com grande número de macrófagos intensamente parasitados, linfócitos e plasmócitos. Esta lesão nodular evolui para ulceração em 90% dos casos. Com o decorrer do tempo, a úlcera adquire bordas elevadas devido ao intenso infiltrado inflamatório e proliferação epitelial. A necrose da derme, epiderme e parede vascular, ocorre quando o nível de anticorpos é elevado. A lesão pode evoluir para cura após o tratamento adequado, originando uma cicatriz fina e sedosa (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998).

Leishmaniose Cutânea pós-Kala-Azar: é causada pela *L.(L.)donovani*, após o tratamento e cura (1-3 anos) da Leishmaniose Visceral. Ocorre a formação de nódulos cutâneos ao redor da boca e nariz em maior frequência, e ainda no tronco e extremidades (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994; BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998).

Leishmaniose Difusa: é uma forma menos freqüente da doença, caracterizada pela deficiência imunitária do indivíduo, isto é, falta de uma resposta aos antígenos do parasita. Inicia-se com uma lesão ulcerativa como descrita anteriormente, e evolui para lesões não ulcerativas, do tipo nodulares, em várias regiões do corpo, principalmente regiões mais frias, podendo atingir linfonodos e nasofaringe. Esta doença é progressiva e crônica, e não responde aos tratamentos convencionais. A disseminação do parasita ocorre através da migração destes por vasos linfáticos ou mesmo por macrófagos parasitados.

Leishmaniose Mucocutânea: conhecida como “espúndia” ou “nariz de anta”, inicia-se como uma típica lesão cutânea no local onde ocorreu a infecção pelo inseto, alcançando áreas de mucosas provavelmente devido à metástase das formas do parasita para novas regiões (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998). Pode ocorrer destruição do septo nasal, laringe e traquéia, levando ao comprometimento da respiração, fala e deglutição, geralmente acompanhado por infecções secundárias, as quais podem levar o paciente ao óbito. Este tipo de lesão tem sido descrita no Novo Mundo em pacientes com o vírus da imunodeficiência (HIV).

Leishmaniose Visceral: é a forma mais severa da doença, podendo levar o paciente à morte. Os sintomas geralmente iniciam-se após o longo tempo de incubação (1-5 meses), como febre irregular, hemorragias (gengivorragias), sudorese, anorexia, fraqueza e emagrecimento, com aumento do volume abdominal. Nos casos avançados da doença, pode ocorrer esplenomegalia, hepatomegalia, linfadenopatia e anemia, com a possibilidade de infecções secundárias como pneumonia ou tuberculose. Formas de transmissão congênita têm sido descritas no Velho Mundo, devido à infecção por *L.infantum*. Também tem sido observada Leishmaniose Visceral em pacientes imunodeprimidos, incluindo pacientes portadores do HIV (ZWILLING & EISENSTEIN, 1994; BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998).

1.1.2 Terapia

Drogas de Primeira Escolha: Dentre as drogas de primeira escolha para tratamento da Leishmaniose em todo mundo, estão o antimonial estibugluconato de sódio (Pentostam) e o antimoniato de metilglucamina (Glucantime). Tais drogas agem na depleção dos níveis de ATP intracelular, devido à interferência na glicólise e β -oxidação de ácidos graxos em amastigotas (BERMAN *et al*, 1985).

Devido às baixas dosagens e tratamentos descontínuos, começaram a ocorrer falhas na terapia e conseqüente aumento das formas resistentes de parasitas (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998; SERENO & LEMESRE, 1997; DIETZE *et al*, 1985; BERMAN & WYLER, 1980). Conforme preconizado pela Organização Mundial de Saúde, as doses de antimoniais não devem ultrapassar o recomendado pela mesma, pois a alta toxicidade já é fator limitante desse grupo de drogas. Mialgias, dores abdominais, alterações hepáticas e distúrbios cardiológicos são freqüentes quando administrados (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998).

Aminas Aromáticas: Para alguns autores, a droga de segunda escolha ainda é a Pentamidina, utilizada desde 1939 para o tratamento da Leishmaniose, sendo utilizada via intramuscular ou intravenosa. Agem em diferentes alvos nas amastigotas, principalmente na interação com ácidos nucléicos, inibindo o processo de replicação e/ou transcrição. A alta toxicidade desta droga também é fator limitante para o uso. Hipoglicemia, hipotensão, alterações cardiológicas, nefrotoxicidade e até mesmo morte repentina foram descritas (BALAÑA-FOUCE *et al*, 1998).

Antibióticos Poliênicos: Ainda considerando-se drogas de segunda escolha, temos a Anfotericina B, um antibiótico anfótero e antifúngico, que se liga às membranas celulares e altera sua permeabilidade, criando poros e o conseqüente extravasamento de íons, levando o parasita à morte. Sua administração mais eficaz se dá por via endovenosa e como as outras, também possui nefrotoxicidade e pode levar à depleção dos níveis de potássio e magnésio no organismo (RANG & DALE, 1991).

Alopurinol: Esta droga de administração oral, age na depleção do ATP e inibe os processos dependentes de energia do parasita. Apesar da baixa toxicidade para células de mamíferos, foram relatados diversos casos em que esta droga não foi eficaz no controle da infecção (BERMAN, 1988; MARTÍNEZ & MARR, 1992).

Outras drogas como Cetoconazol e Itraconazol também são utilizadas em combinações com outros agentes antileishmania, porém não estão isentos de hepatotoxicidade ou mesmo efeitos teratogênicos. Combinações de drogas de uso tópico (paramomicina) com antimoniais têm sido usadas, resultando maiores possibilidades de tratamento, assim como drogas encapsuladas em lipossomos, que ultimamente mostram-se bastante promissoras (PAUL *et al*, 1997; BALANÃ-FOUCE *et al*, 1998; ALVING *et al*, 1978).

Com base nestes dados, observa-se que a terapia combinada contra Leishmaniose é a ferramenta quimioterápica de melhor resultado para o combate à doença. Assim, a pesquisa dentre os possíveis agentes quimioterápicos a partir de fontes naturais poderia ser um caminho alternativo a ser desenvolvido. Além

disso, componentes naturais em geral estão disponíveis e poderiam proporcionar uma diminuição do custo.

Venenos de serpentes contêm um número variado de componentes tais como neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, proteases e nucleases. Um grande número de componentes bioativos tem sido isolado a partir de venenos de serpentes (MENEZ, 1993). Estudos têm mostrado que um grupo de proteínas de baixo peso molecular, isolados a partir do veneno da Cobra (*Hemachatus hemachatus*) apresenta atividade lítica contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ALOOF *et al*, 1968). Efeito bactericida de venenos de *Viperidea* tem sido observado (SKARNES, 1970). Sabe-se ainda que proteínas identificadas como LA0 1 e LA0 2, purificadas a partir de *Pseudechis australis*, têm mostrado efeito bactericida associado com a atividade L-aminoácido oxidase (STILES *et al*, 1991). FERNANDEZ-GOMES *et al* (1994), realizaram estudos preliminares de inibição do crescimento de Tripanossomatídeos por veneno total de *Cerastes cerastes*.

1.2- O VENENO BOTRÓPICO

Em todo o planeta, observa-se cerca de 3000 espécies de serpentes, sendo que apenas 410 são peçonhentas. No Brasil, estão catalogadas 69 espécies peçonhentas, de um total de 256 (BARRAVIERA, 1994).

Dos quatro gêneros de serpentes existentes no território brasileiro, 32 espécies são do gênero *Bothrops* (jararacas), 29 do gênero *Micrurus* (corais),

ambas encontradas em praticamente todo o território nacional; 6 do gênero *Crotalus* (cascavéis), que são encontradas principalmente em regiões secas, e finalmente 2 do gênero *Lachesis* (surucucus), encontradas em regiões mais úmidas como a Floresta Amazônica e Mata Atlântica. (ALLOOF *et al*, 1968; BJARNASON & FOX, 1988; CARDOSO & BRANDO, 1982; BARRAVIERA, 1994).

A grande maioria dos acidentes ofídicos ocorridos no país, é devida às espécies do gênero *Bothrops*, que reúne o maior número de espécies e subespécies (AMARAL *et al*, 1987; HOGE & ROMANO-HOGE, 1979; ROSENFELD, 1967).

Os venenos ofídicos são misturas complexas constituídas principalmente por proteínas (70 a 90%), carboidratos (10 a 30%) e, em pequenas proporções, lipídeos, aminas biogênicas, nucleotídeos, peptídeos e componentes inorgânicos (BJARNASON & FOX, 1988; DEVI, 1968; MOURA-DA-SILVA *et al*, 1990a). Os venenos botrópicos apresentam uma grande variedade de enzimas, como: fosfolipase A₂, L-aminoácido oxidase, hialuronidase, cininogenase, enzimas trombina-símile, ativador de fator X e protrombina, além de várias esterases, endopeptidases e fosfatases (DEVI, 1968; IWANAGA & SUZUKI, 1979). Apesar da diversidade de componentes existentes nestes venenos, os efeitos, decorrentes dos acidentes botrópicos, estão diretamente relacionadas às ações proteolíticas, hemorrágicas e coagulantes (AMARAL *et al*, 1987; BRAZIL & CORBETT, 1982; MANDELBAUM *et al*, 1988; CHIPPAUX *et al*, 1991; FURTADO *et al*, 1991).

A ação proteolítica decorre da ação citotóxica direta nos tecidos, por frações proteolíticas encontradas no veneno. Este quadro pode ser seguido por

liponecrose, mionecrose e lise de paredes vasculares. (BARRAVIERA, 1994; KAISER & MICHEL, 1971; ROSENFELD, 1971). Essas lesões podem ser devidas às múltiplas ações biológicas de uma toxina isolada do veneno, ou mesmo pela ação combinada de determinadas toxinas (AMARAL *et al*, 1987; MANDELBAUM *et al*, 1988; OHSAKA, 1979; QUEIROZ *et al*, 1985).

Os eventos iniciais no envenenamento ofídico podem ser decorrentes de ações de proteases, fosfolipases e fatores hemorrágicos e, secundariamente, à liberação de agentes vasoativos como bradicinina e histamina. Várias metaloproteínas com atividade proteolítica e hemorrágica foram isoladas dos venenos botrópicos, sendo classificadas de acordo com a atividade predominante e especificidade pelo substrato (ASSAKURA *et al*, 1986; MANDELBAUM *et al*, 1976, 1982, 1988, 1989; TANIZAKI *et al*, 1989). As metaloproteínas com atividade proteolítica predominante, são definidas como enzimas que possuem baixa especificidade, alta atividade proteolítica em substratos convencionais como caseína e que, podem produzir hemorragia em animais, quando injetadas em grandes quantidades (ARAGON & GUBENZEC , 1987; MANDELBAUM *et al*, 1982; SPIERKEMAN *et al*, 1973; TANIZAKI *et al*, 1989).

A atividade miotóxica dos venenos botrópicos, normalmente, está correlacionada às proteínas básicas de massa molecular na faixa de 13-18 kDa (MOURA DA SILVA *et al*, 1991). Estas proteínas têm sido isoladas, induzindo rápidas mudanças degenerativas em células musculares, quando injetadas via intramuscular, conduzindo ao quadro de necrose (GUTTIERREZ & LOMONTE, 1989).

A ação hemorrágica é um dos fenômenos mais característicos induzidos pelo veneno botrópico. Esta hemorragia pode ocorrer no local da picada assim como em vários tecidos e órgãos (KAMIGUTI *et al*, 1991; AMARAL *et al*, 1987; OHSAKA, 1979). O mecanismo de ação destas toxinas parece estar baseado na abertura das junções intercelulares entre as células endoteliais, ocasionando o extravasamento (fenômeno hemorrágico). Muitas dessas toxinas, são proteases, que degradam colágeno tipo IV, principal constituinte da lâmina basal que recobre as células endoteliais (GUTTIERREZ & LOMONTE, 1989). As toxinas hemorrágicas, também denominadas “hemorraginas” (GROTTO *et al*, 1967; MANDELBAUM *et al*, 1976) podem ser definidas como enzimas proteolíticas de alta especificidade pelo substrato, que induzem hemorragia quando injetadas em animais em quantidades da ordem de nanogramas, não sendo necessariamente ativas sobre caseína e freqüentemente ativas sobre fibrinogênio (MANDELBAUM *et al*, 1976; MORI *et al*, 1987; OVADIA, 1987; SANCHEZ *et al*, 1987; TU, 1985).

A ação coagulante pode ser decorrente de ações simultâneas como a conversão de fator X em fator X ativado; conversão de protrombina em trombina, na ausência de fator V (ativação direta); conversão de protrombina em trombina, na presença de fator V (ativação indireta) e finalmente da conversão de fibrinogênio em fibrina (atividade trombina-símile) (AMARAL *e al*, 1987; DENSON, 1969; DENSON *et al*, 1972; NAHAS *et al*, 1979; OUYANG *et al*, 1987). Este último evento, conduz ao esgotamento do fibrinogênio, levando à incoagulabilidade sangüínea. O inverso também pode ocorrer, com o consumo de plaquetas e fatores V, VII, causando a coagulação intravascular disseminada, contribuindo para uma insuficiência renal.

Pode-se citar ainda, o isolamento de duas frações do veneno de jararaca, uma agindo diretamente no fibrinogênio, com massa molecular estimada em 71 kDa e a outra capaz de ativar o fator X na presença de fator V, fosfolipídeos e cálcio, concentrada em uma fração de massa molecular 83 kDa (DENSON & ROUSSEAU, 1970; FURUKAWA & HAYASHI, 1977; NAHAS *et al*, 1979). NAHAS *et al* (1979), realizando um estudo comparativo dos diversos mecanismos de ação coagulante, promovidos pelos venenos botrópicos, evidenciaram no veneno de *B. jararaca*, além das atividades descritas anteriormente, a capacidade deste veneno de ativar protrombina diretamente. Por outro lado, GUTIÉRREZ & LOMONTE (1989), sugeriram que as toxinas hemorrágicas também possam exercer atividade miotóxica direta, semelhante à observada em hemorraginas isoladas do veneno de *Crotalus viridis*, *Crotalus atrox* e *Crotalus ruber ruber*. Outros eventos decorrentes dos envenenamentos botrópicos também podem ser observados, como necrose do córtex renal, septicemia e choque, os quais contribuem para os possíveis casos de óbito (JORGE & RIBEIRO, 1990).

Cabe ressaltar, entretanto, que variações interespecíficas de venenos são relatadas, e as atividades de coagulação, necrose e hemorrágica não se encontram distribuídas igualmente. A idade, a dieta e as variações geográficas encontradas para as serpentes, geram as diferentes qualidades e quantidades de toxinas presentes nos venenos (FURTADO *et al*, 1991; FERREIRA *et al*, 1992).

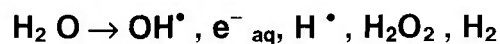
1.3 RADIAÇÃO IONIZANTE

A radiação ionizante tem a propriedade de remover elétrons, geralmente, da camada mais externa do átomo-alvo. Esses elétrons, emitidos durante este processo, possuem apreciável energia, que em muitas vezes, são suficientes para causar a ionização e excitação de moléculas (BUTLER *et al*, 1984). A excitação resultante destas radiações eletromagnéticas permite aos elétrons de camadas mais externas, absorver energia suficiente para atingir um estado energético mais elevado, permanecendo associados ao átomo, emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (GROSCH & HOPYWOOD, 1979).

A unidade Gray (Gy), utilizada em nossos experimentos, é definida no Sistema Internacional de Unidades, como dose de radiação absorvida, equivalente a 1 joule de energia depositada em 1 kilograma de matéria pela radiação ionizante (LATARJET, 1995)

Considerando-se que a água é o principal componente dos materiais biológicos, faz-se necessário o conhecimento das espécies geradas após a sua ionização e excitação, assim como as interações com moléculas-alvo de importância do material submetido ao tratamento com radiação ionizante. Na radiação ionizante, a espécie mais reativa gerada pela radiólise da água é o radical hidroxila (OH^{\bullet}) (CHAPMAN, 1973), que junto com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\bullet-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são capazes de produzir danos às moléculas (GREENSTOCK, 1981).

A ionização ocorre em picosegundos pela formação de radicais hidroxilas livres e elétrons hidratados que são as principais espécies formadas, como descritas a seguir:



A inativação do material biológico pode ocorrer quando existe o efeito direto da radiação, onde o evento primário, isto é, a ionização, é produzida na própria molécula. Este efeito é observado quando um material é irradiado no estado seco. O efeito indireto, resulta em reações entre moléculas do material e espécies produzidas pela radiólise da água, já que o material é irradiado em solução. Estas espécies reativas são produzidas simultaneamente durante o processo de irradiação, que ao se formarem, sofrem várias reações entre si, com o gás dissolvido ou com outras moléculas na solução. Desta forma, quando submete-se um material em solução ao tratamento com radiação ionizante, observa-se a somatória dos efeitos, onde o indireto une-se ao direto.

O estudo do mecanismo envolvido na irradiação de diversos materiais biológicos, tem sido realizado em maiores proporções, visto que o tratamento de radiação ionizante para fins de esterilização de materiais hospitalares, alimentos (SKIENS, 1980) e atenuação de venenos ofídicos, vem sendo utilizado com maior frequência (ROGERO & NASCIMENTO, 1995). No caso de venenos ofídicos, torna-se necessário um estudo mais aprofundado, visto que estes constituem-se principalmente por um conjunto de proteínas, as quais podem apresentar comportamentos diferentes quando irradiadas isoladamente ou em conjunto.

A irradiação de proteínas tanto no estado seco como em solução aquosa, causa várias mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas e em suas estruturas secundárias e terciárias. A reação entre radicais hidroxila, oriundos da radiólise da água, e aminoácidos, geram diversos tipos de produtos, cuja taxa de reação eleva-se na presença de aromáticos (BUTLER *et al*, 1984).

As mudanças ocorridas no material irradiado estão relacionadas com a perda da atividade enzimática, hormonal ou tóxica, assim como com as mudanças das propriedades imunológicas após a irradiação (SKALKA & ANTONI, 1969). Outro fator relevante, é a presença do oxigênio nas irradiações. O efeito da radiação em células, mostrou que o oxigênio potencia os efeitos letais, ou mesmo danos irreparáveis como aberrações cromossômicas e mutações gênicas, observados tanto *in vitro* como *in vivo* (BUTLER *et al*, 1984).

A irradiação de venenos ofídicos e de toxinas isoladas, dentro de um certo intervalo de dose, resulta em um produto de baixa ou mesmo nenhuma toxicidade, preservando porém suas propriedades imunológicas. A atenuação de venenos ofídicos pelo tratamento com radiação (raios X), foi observada por FLOWERS (1963) ao verificar uma menor reatividade das toxinas do veneno. SALAFRANCA (1973), também apresentou dados de destoxicação de veneno de Cobra (*Naja naja philipinensis*) ao submetê-lo ao tratamento com radiação ionizante. Trabalhos mais atuais, corroboram dados obtidos até então, onde venenos de *Bothrops jararaca* e *B. jararacussu* são destoxicados e suas propriedades imunogênicas mantidas, ao se irradiar à dose de 2kGy com raios gama de ^{60}Co (SPENCER, 1995, GUARNIERI, 1992).

Portanto, a atenuação da atividade tóxica do veneno mostrou ser um processo dose-dependente, podendo-se modular essas atividades tanto no veneno bruto quanto em suas frações isoladas. Desta forma, é possível transformar uma toxina de alta toxicidade em um produto atóxico, preservando porém outras atividades que a mesma desempenha. Necessário se faz, a determinação da dose ideal para modular as atividades de interesse (ROGERO & NASCIMENTO, 1995).

Considerando-se:

- a problemática da Leishmaniose no Brasil, com ênfase à dificuldade existente no tratamento,
- venenos de serpentes sendo utilizados na inibição do crescimento de protozoários e,
- o poder de destoxicação de venenos pela radiação ionizante.

Um estudo envolvendo a inibição do crescimento de protozoários por venenos seria de interesse. Nesse sentido, estudos preliminares utilizando-se venenos de serpentes brasileiras, apontaram os venenos das serpentes do gênero *Bothrops* como um dos mais eficazes. Assim, escolheu-se o veneno de *B. moojeni* para um estudo mais detalhado.

Uma rápida caracterização da serpente *Bothrops moojeni*, conhecida como caissaca, mostra que ela é uma serpente de porte médio, podendo ultrapassar 1,50m de comprimento. Tem a pele de cor característica, marrom-aveludada. É uma serpente terrestre bastante agressiva que vive em áreas secas e quentes, sendo encontrada na região Sul, Sudeste, e Centro-Oeste do país (BARRAVIERA, 1992)

-2- OBJETIVOS

- 1- Verificar a ação antileishmania do veneno total de *Bothrops moojeni*.
- 2- Isolar e caracterizar a fração responsável pela atividade.
- 3- Estudar a fração na forma irradiada.

3.1 Cultivo de Promastigotas

As cepas IFLA/BR/67/PH 8 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, M 6445 de *Leishmania (Leishmania) chagasi* e MI 3237 de *Leishmania (Viannia) panamensis*, foram cultivadas, na forma promastigota, em meio RPMI 1640 sem vermelho de fenol, suplementado com 20% de soro fetal bovino, hemina 0,25% e gentamicina (20µg/ml), à temperatura de 25°C. As amastigotas de *L.(L.) amazonensis* (cepa LV-79), gentilmente cedidas pela Dra. Sílvia C. Alfieri do Instituto de Ciências Biomédicas-USP, foram cultivadas em meio UM- 54 pH 5,8 a 33°C (BALANCO *et al*, 1998). Tanto as promastigotas, quanto as amastigotas foram utilizadas nos ensaios em fase logarítmica final de crescimento.

3.2 Ensaio de Viabilidade Celular- MTT

O crescimento e viabilidade das promastigotas nos ensaios “*in vitro*”, foram verificados pelo método do MTT (TADA *et al*, 1986). O MTT (3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl-tetrazolium bromide) é um cromógeno que age como substrato no processo respiratório oxidativo de mitocôndrias. Devido às desidrogenases mitocondriais da célula, este produto é reduzido a seu subproduto formazan. Assim, através da leitura da densidade óptica (D.O.) em 570nm, é possível quantificar as células viáveis do sistema utilizado. O MTT, na forma de um pó amarelo fino, foi dissolvido em solução HBSS, na concentração de 2mg/ml, e posteriormente esterilizado por filtração em membrana de 0,22µm. Após o ensaio da atividade tóxica do veneno sobre as células (18-24 horas), a placa foi

centrifugada (centrífuga 5804R -EPPENDORF) a 3000 rpm por 10 minutos, desprezado o sobrenadante e aplicado o MTT (50µl/poço). Após 4 horas (em estufa 25°C) a placa foi novamente centrifugada nas mesmas condições, desprezado o sobrenadante e o formazan foi extraído das mitocôndrias pela adição de 60µl/poço de SDS-HCl 10% - 0,01M, por um período de 18 horas em estufa a 25°C. Em seguida, foi realizada a leitura da D.O. em 570nm em espectrofotômetro LABSYSTEMS MULTISKAN MS.

3.3 Determinação da Atividade Antileishmania

Para se determinar a atividade antileishmania do veneno total de *B.moojeni*, realizou-se uma diluição seriada do mesmo em placa de 96 poços, seguido do ensaio de viabilidade celular com MTT. O veneno total de *Bothrops moojeni*, cristalizado, foi dissolvido em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,5 e centrifugado a 13,500 rpm por 5 minutos. Seu conteúdo protéico foi determinado pelo método de BRADFORD (1976). O veneno total foi diluído em meio de cultura RPMI 1640 na placa de 96 poços, com a concentração variando de 20,00µg/ml a 0.15µg/ml (fator de diluição= 2). A contagem das promastigotas foi realizada em câmara de Neubauer e posteriormente adicionadas à placa na concentração de 4×10^6 /ml, perfazendo-se um volume total no poço de 100µl. A placa foi então incubada a 25°C por um período de 18 horas e posteriormente verificada a viabilidade celular, mantendo-se sempre promastigotas em poços sem adição de veneno para o grupo controle do ensaio.

Para se verificar as frações cromatográficas com atividade antileishmania, realizou-se um ensaio em placa de 96 poços, com 20µl de cada fração e 4 X

10^5 /poço promastigotas de *L.(L.) amazonensis*, incubados em estufa a 25°C por um período 18 horas. A viabilidade foi determinada pelo método do MTT.

3.4 Purificações

3.4.1 Purificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Exclusão Molecular

Após a verificação da atividade antileishmania do veneno total sobre as promastigotas, partiu-se para uma tentativa de se obter a fração, ou mesmo, as frações, responsável(is) pela mesma. Desta forma, submeteu-se o veneno total a uma cromatografia de exclusão molecular, onde, através desta técnica, obteve-se a separação dos componentes do veneno pelas suas respectivas massas moleculares.

O veneno total (110mg) foi diluído em 1 ml de tampão Tris-HCl 50mM pH 8,5 e centrifugado a 13.500 rpm (centrífuga Centrimicro 242- Fanen) por 5 minutos. Posteriormente foi aplicado em uma coluna Superdex 200 prep grade (1.6X70cm) (Pharmacia), previamente equilibrada em mesmo tampão. O sistema foi acoplado a um FPLC (Fluid Pressure Liquid Chromatography) com um fluxo de 1ml/minuto. O eluato foi coletado (1ml/tubo) em um coletor FRAC 200 (Pharmacia), acompanhando-se a leitura da D.O. em 280nm.

3.4.2 Repurificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Troca Iônica

As frações com atividades antileishmania ou L-aminoácido oxidase, foram reunidas e recromatografadas em troca iônica, afim de se obter um maior grau de

pureza. Esta técnica baseia-se na separação dos componentes através da diferença de cargas das proteínas, visto que variações de ponto isoelétrico são esperadas para diversas proteínas do veneno. Para realização desta cromatografia, foi utilizada uma coluna Resource Q 5/5 (Pharmacia), previamente equilibrada em tampão (A) Tris-HCl 50mM pH 8,5. O sistema foi acoplado a um FPLC, como descrito anteriormente, com fluxo de 1ml/minuto. Após a eluição de 10ml de tampão (15% B) pela coluna, iniciou-se um gradiente de 15-40% e posteriormente 40%-100% de tampão B (Tris-HCl 50mM pH 8,5 NaCl 1M) para obtenção das frações aderidas a coluna, com a leitura da D.O. em 280nm. Em seguida, com a finalidade de se eliminar a alta concentração salina das frações reunidas, após determinação das respectivas atividades, dialisou-se em tampão Tris-HCl 50mM pH 8,5 e posteriormente foram concentradas por centrifugação em sistema AMICON. Cabe ressaltar, que antes da estocagem do material, adicionou-se 1 μ M de FAD com o intuito de se preservar o grupo prostético da enzima (SÁNCHEZ *et al*, 1991).

3.5 Determinação da Atividade L-aminoácido Oxidase (LAO)

3.5.1 Frações Cromatográficas

A atividade L-aminoácido oxidase foi determinada nas frações provenientes de cromatografias de exclusão molecular e troca iônica, em um ensaio colorimétrico em placa de 96 poços. O ensaio é uma adaptação do teste desenvolvido por TORII *et al* (1997) , onde a peroxidase é utilizada para reagir com o H₂O₂ produzido pela ação da LAO, seguido de uma reação com o-phenylenediamine (OPD), gerando-se um subproduto solúvel e colorido . A

solução para a reação contém tampão Tris/HCl 100 mM pH 8,5, L-leucina 3mM como substrato, horseradish peroxidase (10 UI/ml) and OPD (0.1mg/ml). As amostras foram incubadas por 1 hora a 25°C, e a D.O. determinada em 414nm, a cada 5 minutos.

3.5.2 Determinação da Atividade LAO e Atividade Específica

A determinação da atividade L-aminoácido oxidase (nmoles de H₂O₂/min/ml) e atividade específica (U/μg) do veneno total e da fração purificada, nativa e irradiada, foram realizadas utilizando-se o procedimento descrito anteriormente (item 3.6.1), variando-se a concentração das amostras (20,00μg/ml a 0,15μg/ml). Uma curva padrão de peróxido de hidrogênio foi desenvolvida e o cálculo da regressão linear, realizado pelo GraphPad Prism Software.

3.6 Isofocalização Elétrica (IEF)

Para se verificar a ausência de contaminantes na enzima purificada (LAO) e determinar seu ponto isoelétrico (pI), foi realizado uma isofocalização elétrica em um sistema Multiphor II (Pharmacia Biotech), através de um gel de poli-acrilamida 5% com anfolinas (3,5-9,5) e os seguintes padrões de ponto isoelétrico: amiloglicosidase (pI= 3,55), vermelho de metil (pI=3,75), inibidor de tripsina (pI=4,55), β-lactoglobulina A(pI=5,13), anidrase carbônica bovina(pI= 5,85), anidrase carbônica humana (pI= 6,57), mioglobulina (pI= 6,76-7,16) e tripsinogênio (pI= 9,3). Uma fita de papel impregnada em NaOH 1M foi colocada no polo negativo e outra em H₃PO₄ 1M no polo positivo para gerar as cargas. Após a polimerização do gel de acrilamida (24horas), realizou-se uma pré-corrída (1500V;

50mA; 25W) por 30 minutos para gerar o gradiente de pH. Logo em seguida aplicou-se as amostras (10 μ g) e iniciou-se a corrida por mais 90 minutos. Em seguida, prosseguiu-se com a fixação das proteínas (TCA/ac.sulfosalicílico) por 30 minutos. O gel foi corado em solução de Coomassie Brilliant Blue R 250 (SIGMA) e descorado em etanol/ácido acético

3.7- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

A composição protéica e a determinação da massa molecular das amostras, foram realizadas em SDS-PAGE (sistema Mini-Protean- BioRad), de acordo com o método de LAEMMLI (1970), em condições denaturantes, com ou sem adição de 2- β -mercaptoetanol. Os seguintes padrões de massa molecular foram utilizados para extrapolação das massas moleculares: fosforilase B (97,4kDa), albumina bovina (66,0kDa), ovoalbumina (45,0kDa), anidrase carbônica (29,0kDa). As amostras (10-30 μ g), foram dissolvidas em tampão de amostra contendo glicerol, dodecil sulfato de sódio 10% (SDS), azul de bromofenol e posteriormente fervidas a 100 $^{\circ}$ C por 5 minutos.

A concentração do gel de poliacrilamida foi de 10% e a coloração do mesmo realizou-se com Coomassie Brilliant Blue G-250. A estimativa das massas moleculares foi realizada, utilizando-se a regressão linear com valores dos padrões descritos, pelo GraphPad Prism Software.

3.8- Análise da LAO em HPLC

Através de uma cromatografia de exclusão molecular em HPLC (High Performance Liquid Chromatography- WATERS), em coluna TSK-G2000SW (TOSOHAAS) (60,0cm X 7,5mm) previamente equilibrada com tampão

bicarbonato de amônio 50mM pH 7.0, foi possível verificar o grau de pureza da LAO purificada de *B. moojeni*, como também compará-la a uma L-aminoácido oxidase comercial (SIGMA), proveniente de veneno de *B. atrox*. O fluxo utilizado foi de 1ml/minuto e a absorvância do eluato determinada em 280nm.

3.9 Irradiação da Fração Purificada

Uma vez observada na literatura a toxicidade da enzima L-aminoácido oxidase contra diferentes tipos de células (AHN *et al*, 1997), submeteu-se a fração purificada (LAO) à irradiação, para se verificar uma possível redução de sua toxicidade. A enzima teve seu conteúdo protéico avaliado pelo método de BRADFORD (1976) e em seguida, irradiada na concentração de 0,75mg/ml. Foram utilizadas diferentes doses de radiação (0,5kGy-5kGy), com raios gama de ⁶⁰Co (GAMMACELL). A irradiação foi realizada com blindagem de chumbo (90%) à temperatura ambiente. A taxa de dose da fonte era de 7.48kGy por hora.

3.10 Determinação da Concentração Efetiva 50% (CE₅₀) da LAO

A toxicidade (CE₅₀) das amostras foi determinada contra promastigotas de diferentes espécies, como *Leishmania(L.)amazonensis*, *Leishmania (L.) chagasi* e *Leishmania (V.)panamensis*, utilizando-se o ensaio de viabilidade com MTT. A concentração protéica adicionada, variou de 20,00 a 0,15µg/ml (fator de diluição= 2), seguido da incubação por 18 horas com 4 X 10⁵ promastigotas/poço a 25°C. Controles foram utilizados sem a adição das amostras para observação da viabilidade total, assim como poços sem promastigotas, para serem utilizados como branco. A porcentagem de morte foi estimada segundo a equação descrita:

$\% \text{ morte} = ((D.O. \text{ poço controle} - D.O. \text{ poço com amostra}) / D.O. \text{ poço controle} \times 100)$.

Com os resultados obtidos, realizou-se o cálculo da CE_{50} em uma curva do tipo sigmóide dose-resposta, analisada pelo GraphPad Prism Software. Para efeitos comparativos, utilizou-se L-aminoácido oxidase comercial (SIGMA) proveniente do veneno de *Bothrops atrox*. Após a determinação de sua concentração protéica pelo método de BRADFORD (1976) a enzima comercial foi diluída em meio RPMI 1640 na concentração inicial de $20\mu\text{g/ml}$ até $0.156\mu\text{g/ml}$ (fator de diluição=2) e incubada com promastigotas de *L.(L.) amazonensis*. A viabilidade celular e o cálculo da CE_{50} foram realizados como descrito anteriormente.

Com o objetivo de se verificar a possível atividade antileishmania da enzima L-aminoácido oxidase nas formas amastigotas do parasita, realizou-se também um ensaio do tipo CE_{50} em placa de 96 poços. As amastigotas de *L.(L.) amazonensis* (cepa LV-79), foram cultivadas em meio UM- 54 pH 5,8 a 33°C (BALANCO *et al*, 1998). Diluiu-se a enzima em meio RPMI-1640 na concentração inicial de $100\mu\text{g/ml}$ a $0,049\mu\text{g/ml}$ (fator de diluição= 2). Amastigotas foram adicionadas ($5 \times 10^5/\text{poço}$) e incubadas por um período de 18 horas a 33°C . A viabilidade celular foi verificada pelo método do MTT. Peróxido de hidrogênio exógeno (SIGMA) foi adicionado e diluído em meio RPMI-1640, afim de se observar a susceptibilidade das amastigotas ao mesmo produto tóxico gerado pela enzima, responsável pela atividade antileishmania. Para isto, 20mM de H_2O_2 foram diluídos no meio até 0.01mM (fator de diluição= 2) e 5×10^5 amastigotas

foram adicionadas por poço. A placa foi incubada nas mesmas condições descritas anteriormente e ensaiada pelo método do MTT.

3.11 Estudo do Mecanismo de Ação da LAO Sobre as Promastigotas

As promastigotas de *L.(L.)amazonensis* (4×10^5 /poço) foram incubadas em meio RPMI-1640 (placa de 96 poços) com LAO (30 μ g/ml) e catalase (0,3mg/ml), num volume final de 100 μ l/poço, por um período de 18 horas a 25 $^{\circ}$ C, com o objetivo de se eliminar a ação do H₂O₂. Controles sem a LAO, na presença ou ausência de catalase, adicionados ou não, de peróxido de hidrogênio exógeno 5mM, também foram testados. A incubação da LAO com as promastigotas, foi feita ainda em uma solução salina tamponada (HBSS) sem a adição de aminoácidos nas mesmas condições descritas anteriormente (item 3.2). A viabilidade foi determinada através do método do MTT.

3.12 Estudos Ultraestruturais

Com o objetivo de se observar o(s) dano(s) causado(s) pela ação da enzima na(s) estrutura(s) do parasita, foi realizado o seguinte estudo em microscópio eletrônico.

Promastigotas de *L.(L.)amazonensis*, foram incubadas em placa de 24 poços (4 x 10⁶/ml) com 30 μ g/ml da fração purificada. Após os tempos determinados de incubação (4-8-18 horas) em estufa a 25 $^{\circ}$ C, estas foram centrifugadas a 3000 rpm por 5 minutos e fixadas em 100 volumes de glutaraldeído 4%, lavadas em PBS e contrastadas em tetróxido de ósmio 1%. Em seguida, o material foi incluído em resina Araldite epoxi para observação em microscópio eletrônico (JEOL).

3.13 Ensaio de Toxicidade da LAO em células LLCMK-2

Para verificar a toxicidade da L-aminoácido oxidase purificada de *B. moojeni* às células de mamífero, foi realizado um ensaio do tipo C.E.₅₀ em células LLCMK-2.

Em placa de 96 poços, diluiu-se a enzima em meio de cultura RPMI 1640 na concentração inicial de 100µg/ml, até 0,049µg/ml (fator de diluição= 2), em triplicata. As células foram adicionadas (5×10^4 / poço) e incubadas a 37°C em estufa com 5% de CO₂ por um período de 24 horas. A viabilidade celular foi realizada pelo método do MTT. Poços com células sem adição da LAO foram mantidos como controles.

4.1- Purificações

4.1.1 Purificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Exclusão Molecular: O veneno de *B.moojeni* foi dissolvido em tampão de eluição, centrifugado, afim de se eliminar partículas não solúveis e aplicado em uma coluna Superdex 200 como descrito anteriormente em Métodos. A D.O. das frações, determinada em 280nm (Fig.2), resultou em quatro picos protéicos. A atividade antileishmania, detectada pelo do método do MTT contra promastigotas de *L.(L.)amazonensis* e a atividade L-aminoácido oxidase, determinada através do ensaio com L-leucina (Fig.2), eluíram no mesmo pico (pico1), que encerram proteínas de elevada massa molecular. Utilizando proteínas padrões para calibração da coluna, a massa molecular estimada para a enzima purificada foi de 140kDa. Nas frações do primeiro pico, onde ambas atividades se encontram, foi observado intensa coloração amarela, resultante da própria composição da enzima (FAD). Desta forma, sem quaisquer processos adicionais, as frações de interesse foram reunidas e recromatografadas posteriormente em troca iônica.

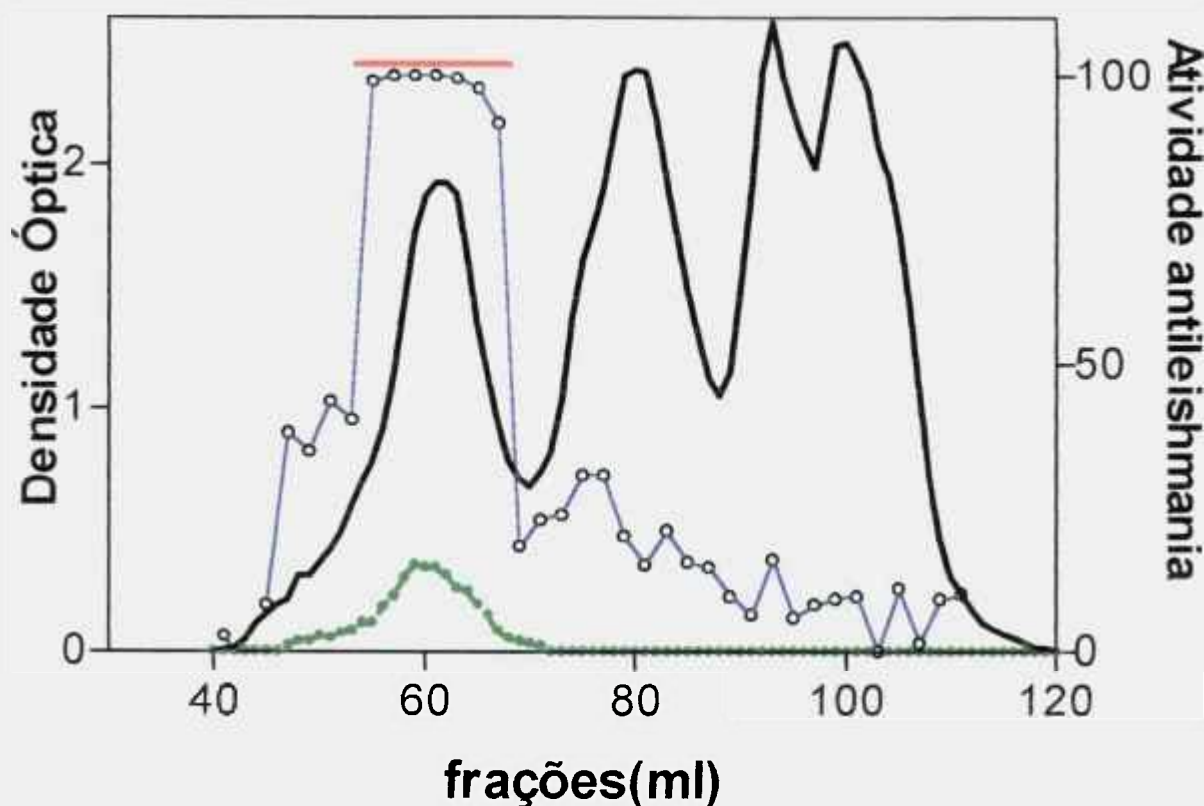


Fig.2 Cromatografia de exclusão molecular do veneno de *B.moojeni*, em coluna Superdex 200 equilibrada em Tris-HCl 50mM pH 8.5. O fluxo de eluição foi de 0,5ml/min. Linha preta sem símbolos= D.O. 280nm; linha verde com círculos fechados= atividade L-aminoácido oxidase (D.O.414nm); linha azul com círculos abertos= atividade antileishmania (D.O. 570nm).

4.1.2 Repurificação da Fração Antileishmania por Cromatografia de Troca Iônica:

As frações reunidas, provenientes do processo de exclusão molecular, foram aplicadas à uma coluna Resource Q 5/5 e submetidas a um gradiente salino. Através da D.O., determinada em 280nm, foram obtidos dois picos protéicos, onde observa-se um primeiro não aderido à coluna, e o segundo aderido, eluído com

aproximadamente 300mM de cloreto de sódio, como observado na Fig. 3. As respectivas atividades, antileishmania e L-aminoácido oxidase, apresentaram o mesmo perfil de eluição, como observado no segundo pico da cromatografia (Fig.3). Após a diálise e concentração do material por centrifugação em sistema Amicon, observou-se mais uma vez, a intensa coloração amarelada das amostras.

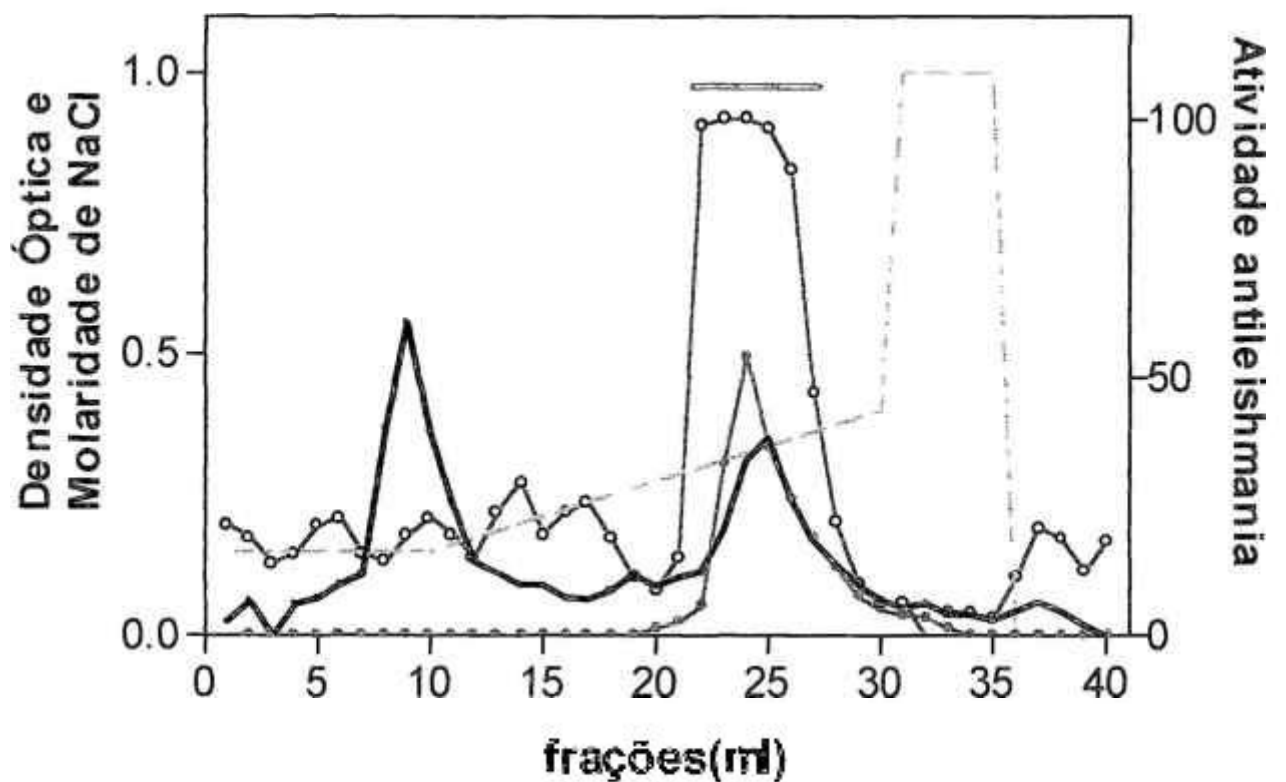


Fig.3 Cromatografia de troca iônica das frações reunidas com atividades LAO ou antileishmania em coluna Mono Q, equilibrada previamente com Tris-HCl 50mM pH 8,5. Linha preta sem símbolos= D.O. 280nm; linha verde com círculos fechados= atividade L-aminoácido oxidase (D.O.414nm); linha azul com círculos abertos= atividade antileishmania (D.O. 570nm); linha pontilhada= molaridade do NaCl.

4.2- Isofocalização Elétrica (IEF)

Através desta metodologia, foi possível classificar a enzima em estudo, como uma proteína ácida, devido a seu ponto isoelétrico encontrar-se próximo ao pH 4,8 (Fig.4). A enzima purificada migrou como uma banda única, como observada após coloração do gel com Coomassie Brilliant Blue (SIGMA). O cálculo do ponto isoelétrico da enzima, foi determinado pelos valores dos padrões, analisados por regressão linear no GraphPad Prism Software.

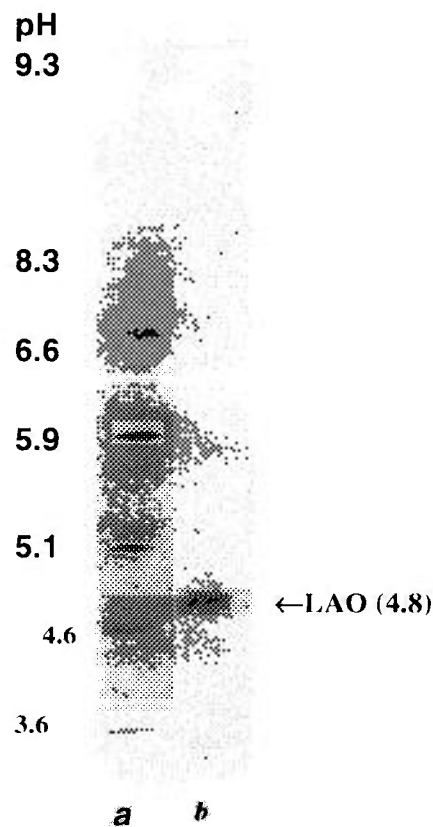


Fig.4 Isofocalização elétrica em gel de poliacrilamida 5% da LAO purificada do veneno de *Bothrops moojeni*. **a)** padrões de ponto isoelétrico **b)** LAO

4.3- Eletroforese em Gel de Poliacrilamida (SDS-PAGE)

Após as etapas de purificação e identificação das frações com atividades antileishmania ou L-aminoácido oxidase, estas foram agrupadas e submetidas a uma eletroforese em gel de poliacrilamida 10%. A enzima purificada migrou como uma banda única, com massa molecular estimada de 69kDa, após o tratamento com 2-β-mercaptoetanol, como observado na Fig.5. Padrões foram utilizados para extrapolação da massa molecular, desenvolvida em uma regressão linear no GraphPad Prism Software.

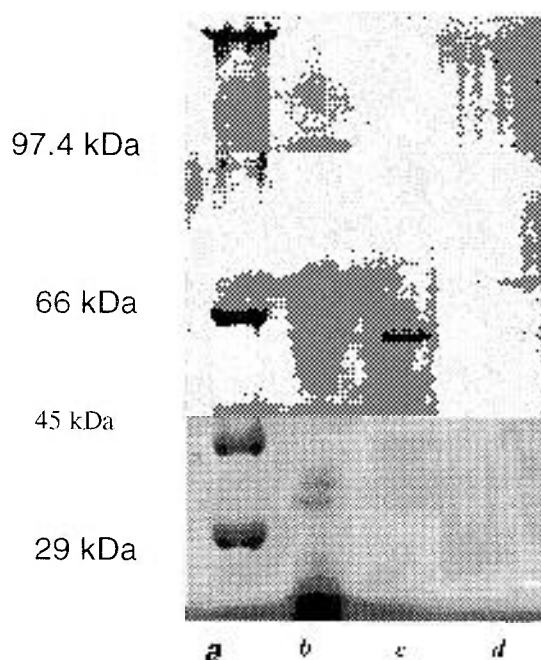


Fig.5 SDS-PAGE em gel de poliacrilamida 10%. **a**-Padrões de massa molecular. **b**- Veneno total de *B.moojeni*. **c**- Frações reunidas da cromatografia de exclusão molecular. **d**- Frações reunidas da cromatografia de troca iônica (LAO).

4.4- Análise da LAO em HPLC

A cromatografia em HPLC da enzima previamente purificada de *B.moojeni*, em coluna TSK G-2000 SW (TOSOHAAS 60 X 7,5cm) de exclusão molecular, resultou em um pico protéico majoritário e um segundo pico de menor proporção, eluindo concomitantemente (Fig.6A). A área do pico principal corresponde a aproximadamente 80%, mostrando um elevado grau de pureza da fração. A análise da enzima LAO comercial nas em mesmas condições experimentais, mostrou diversos picos protéicos (Fig.6B), sugerindo que em ambas cromatografias, possa existir algum processo de degradação da enzima devido às condições utilizadas ou mesmo algum tipo de contaminação.

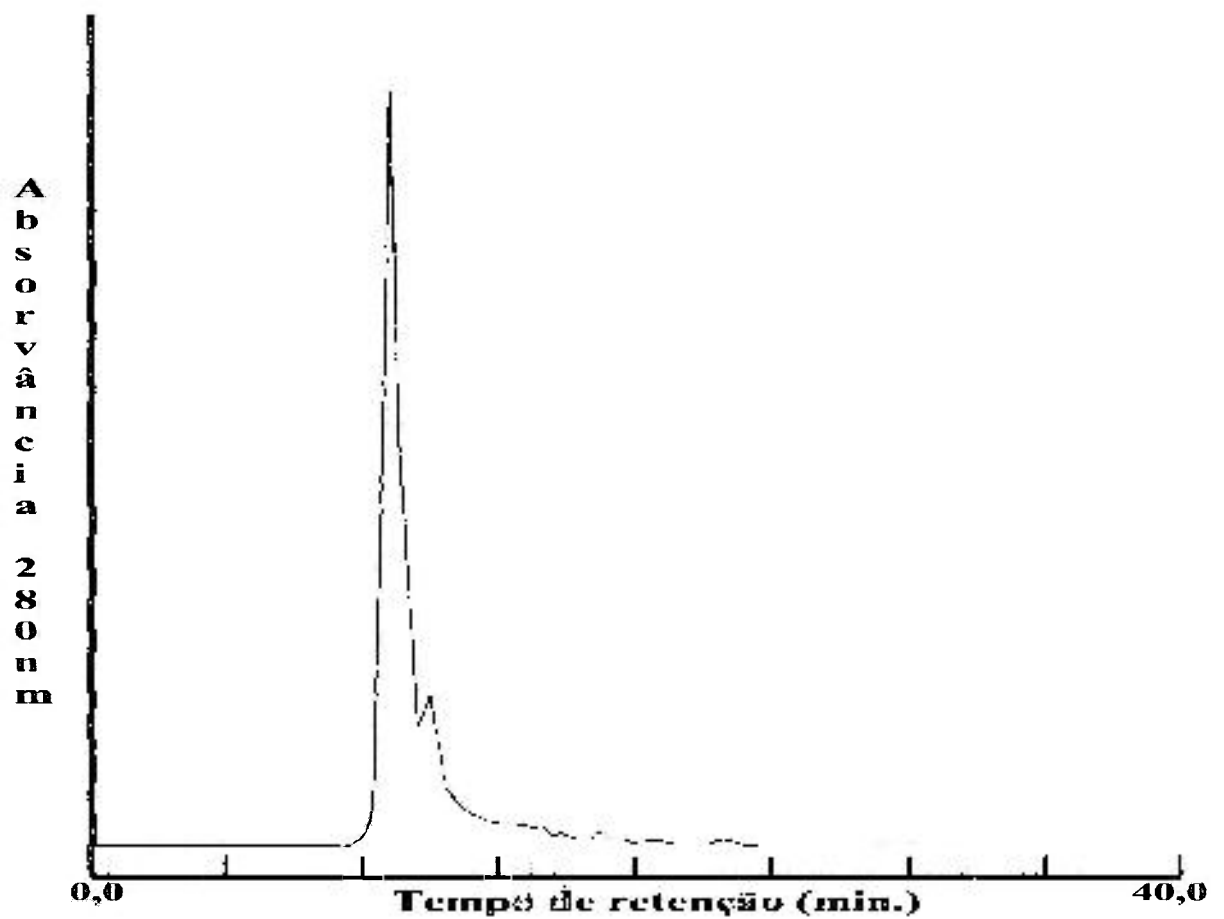


Fig.6 A. Análise da L-aminoácido oxidase do veneno de *B.moojeni* em HPLC. Coluna de exclusão molecular TSK G-2000 SW (TOSHAAS 60,0cm X 7,5mm) previamente equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 50mM pH7.0. O fluxo utilizado foi de 1ml/min e a absorvância determinada em 280nm.

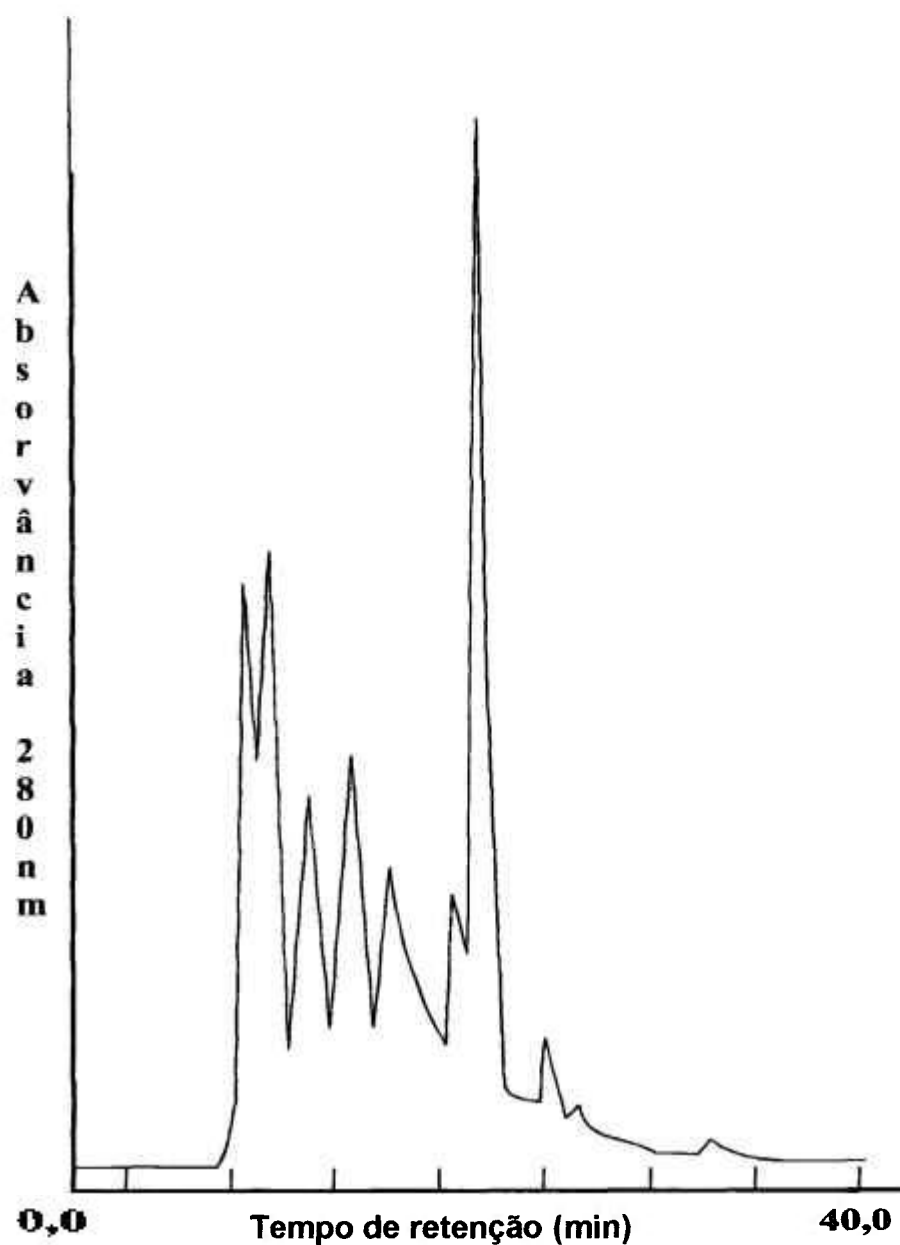


Fig.6 B. Análise da L-aminoácido oxidase comercial de veneno de *B. atrox* em HPLC. Cromatografia de exclusão molecular em coluna TSK G-2000 SW (TOSOHAAS 60,0cm X 7,5mm) previamente equilibrada em tampão bicarbonato de amônio 50mM pH 7,0. O fluxo utilizado foi de 1ml/min e a absorvância do eluato foi determinada em 280nm.

4.5- Atividade L-aminoácido oxidase (LAO)

Utilizando-se uma curva padrão de peróxido de hidrogênio, a atividade LAO (nmoles H_2O_2 /ml/min), assim como a atividade específica (U/ μ g) foram determinadas para o veneno total e para a fração purificada. Observou-se o gradativo aumento da atividade enzimática, conforme o veneno total era purificado. Após o último processo cromatográfico, e reconstituição da enzima com FAD, constatou-se que a atividade LAO purificada, é 135 vezes maior do que quando associada ao veneno total. Todavia, a LAO apresenta-se em pequenas proporções, totalizando 1,5% do veneno de *B. moojeni*, como observado na Tabela 2.

Etapa de Purificação	Proteínas totais (mg/ml)	% do veneno bruto	Atividade LAO (nmoles H_2O_2 /min/ml)	Atividade específica (U/ μ g)
Veneno total	297,0	100%	0,042	0,017
Cromatografia de Exclusão Molecular	40,0	13,5%	0,196	0,078
Cromatografia de Troca Iônica	4,30	1,5%	5,740	2,296

Tab.2 Tabela de purificação da L-aminoácido oxidase purificada do veneno de *B.moojeni*.

A atividade enzimática da LAO após o tratamento com raios gama de ^{60}Co , foi determinada como observado na Tabela 3. Conforme verificado para a atividade antileishmania após irradiação, observa-se um decréscimo na atividade LAO em doses diferentes de 2kGy. Comparando-se com a enzima em seu estado

nativo, isto é, não tratada com radiação, a irradiada com 2kGy reduz a atividade oxidativa em 21% (Tab.3). Doses acima de 3kGy conferem uma provável inativação da enzima, visto que a produção de peróxido não foi detectada em nossos ensaios.

L-aminoácido oxidase	Atividade (nmoles H ₂ O ₂ /min/ml)	Atividade Específica (U/μg)
LAO nativa	5,74	2,29
LAO 0,5kGy	1,78	0,71
LAO 1kGy	2,75	1,10
LAO 2kGy	4,50	1,80
LAO 3kGy	1,71	0,69
LAO 4kGy	----	----
LAO 5kGy	----	----

Tab.3 Atividade L-aminoácido oxidase da enzima (LAO) nativa e irradiada em diferentes doses com raios gama de ⁶⁰Co. Valores calculados através de regressão linear (GraphPad Prism) a partir de uma curva padrão de peróxido de hidrogênio.

4.6- Determinação da Concentração Efetiva 50% (C.E.₅₀)

Partindo-se de uma diluição seriada do veneno total e da fração purificada, foi possível determinar as relativas concentrações efetivas, analisadas em uma curva do tipo sigmóide dose-resposta pelo GraphPad Prism Software. Para o veneno total, obteve-se uma CE₅₀ de 6,84µg/ml (6,75-6,92µg/ml) e para a fração purificada C.E.₅₀ de 1,81µg/ml (1,81-1,89µg/ml), utilizando promastigotas de *L.(L.) amazonensis* como observado na Fig.7A e Tabela 4.

Apesar do grau de purificação de 135 vezes, determinado pelo ensaio enzimático (item 3.5.2 -Métodos), a LAO apresentou, neste experimento, apenas 3.8 vezes maior atividade que o veneno total. Diferentes susceptibilidades também foram observadas para duas outras cepas utilizadas, quando incubadas com a LAO nas mesmas condições experimentais (Tab.4). A concentração efetiva 50% (CE₅₀) para *L.(L.)chagasi* e *L.(V.)panamensis*, foi de 0,63µg/ml (0,50-0,80µg/ml) e 0,78µg/ml (0,63-0,95µg/ml), respectivamente.

Quando a enzima purificada foi submetida ao tratamento com raios gama de ⁶⁰Co, em variadas doses, observou-se diferentes comportamentos. A dose de 2kGy provavelmente não alterou a enzima de forma a inativar sua atividade antileishmania ou mesmo oxidativa, quando comparada às diferentes doses utilizadas. Na dose de 2kGy, observou-se a perda de praticamente metade de sua atividade antileishmania, como detectada pelo MTT. Doses diferentes de 2kGy, danificaram a atividade da enzima, como constatado experimentalmente (Fig.7B).

	Veneno total	LAO nativa	LAO 0.5kGy	LAO 1kGy	LAO 2kGy	LAO 3kGy	LAO 4kGy	LAO 5kGy
EC50% (µg/ml)	6,84	1,80	4,52	4,57	2,96	10,05	>20,00	>20,00

Tab.4 Concentração efetiva 50% do veneno total de *B.moojeni* e sua respectiva fração L-aminoácido oxidase nativa e irradiada em diferentes doses por raios gama de ^{60}Co , contra promastigotas de *L.(L.) amazonensis*.

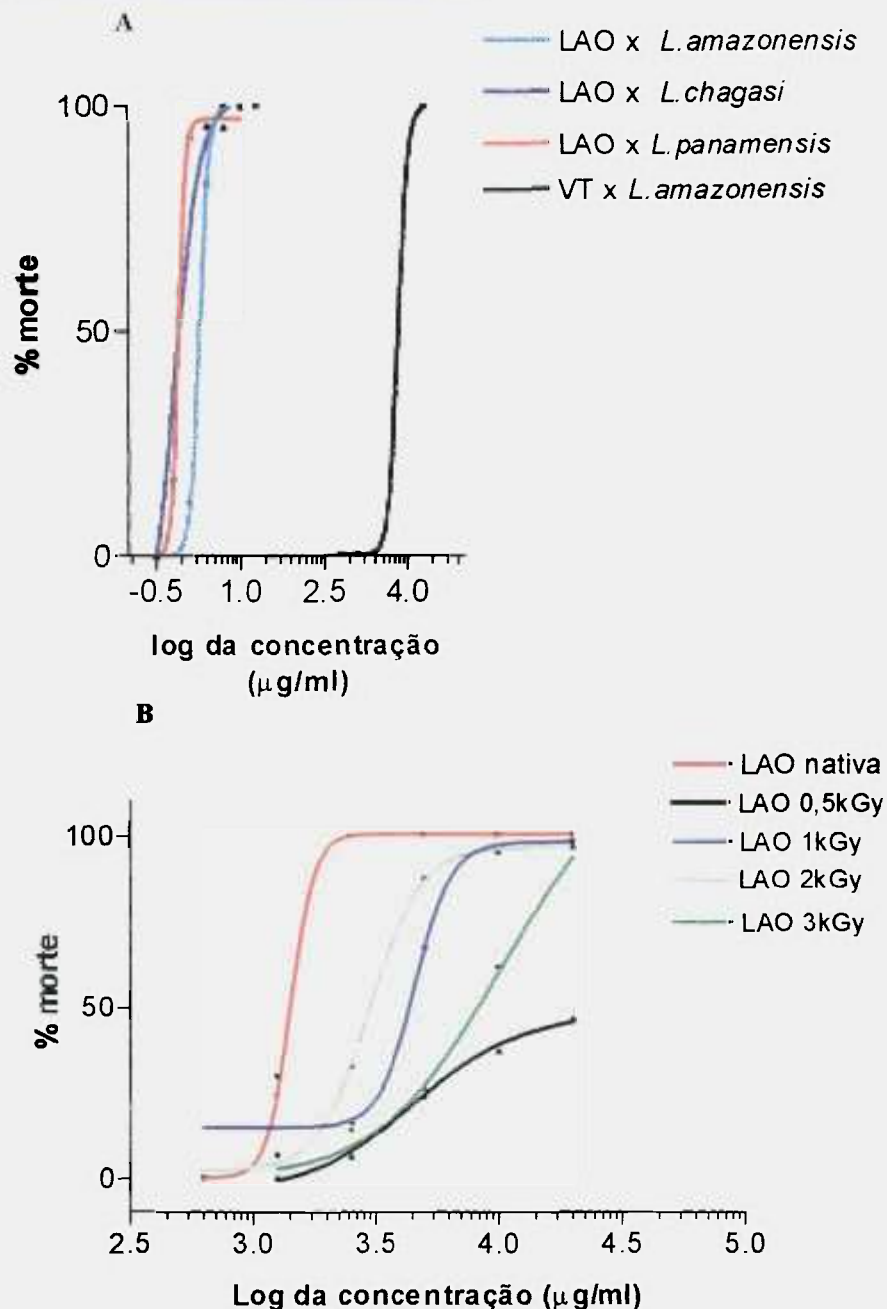


Fig.7 A- Concentração efetiva 50% do veneno total de *B.moojeni* sua fração purificada (LAO), contra diferentes espécies de *Leishmania* spp. **B-** Concentração Efetiva 50% da LAO irradiada em diferentes doses com raios gama de ^{60}Co , contra promastigotas de *L.(L.)amazonensis*. Curvas do tipo sigmóide dose-resposta analisadas pelo GraphPad Prism Software. A concentração foi expressa em na forma logarítmica ($\mu\text{g/ml}$).

Para efeitos comparativos, utilizou-se a enzima L-aminoácido oxidase comercial em promastigotas de *L.(L.)amazonensis*, nas mesmas condições experimentais descritas anteriormente. A concentração efetiva 50 % (CE₅₀) encontrada foi superior (3,20µg/ml - 2.18-4.70µg/ml) à observada para LAO de *B.moojeni*, descrevendo uma menor ação antileishmania da mesma.

As amastigotas de *L.(L.) amazonensis*, após incubação com a L-aminoácido oxidase, purificada do veneno de *B.moojeni*, conforme descrito em Métodos, apresentaram 100% viabilidade como observado pelo método do MTT. A incubação das mesmas com peróxido de hidrogênio exógeno conferiu a morte dos parasitas, com uma concentração efetiva 50% (CE₅₀) de 0,67mM (Fig. 8), determinado através do método do MTT e calculado através de uma curva sigmóide dose-resposta pelo GraphPad Prism Software.

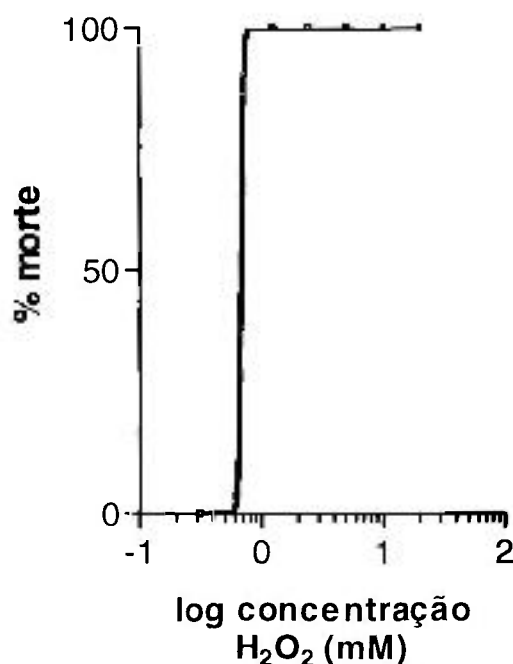


Fig.8 Concentração efetiva 50% de peróxido de hidrogênio exógeno em amastigotas de *L.(L.) amazonensis*. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT e a curva sigmóide dose-resposta foi analisada pelo GraphPad Prism Software. A concentração foi expressa na forma logarítmica (mM).

4.7- Estudo do Mecanismo de Ação da LAO Sobre as Promastigotas

Catalase foi adicionada ao meio de cultura para eliminação do H₂O₂ formado pela ação da LAO. As promastigotas incubadas com a enzima purificada na presença de catalase, apresentaram 100% de sobrevivência, como observado pelo método de viabilidade do MTT, demonstrando que o H₂O₂ produzido pela ação da LAO é essencial para a atividade antileishmania (Fig.9). A eliminação do substrato também foi testada, e as promastigotas após incubação com a enzima nessas condições, apresentaram novamente 100% de sobrevivência (Fig.9). A

adição de peróxido de hidrogênio exógeno às promastigotas, conferiu morte dos parasitas, como observado na Fig.9. Esses resultados demonstram claramente que a ação da L-aminoácido oxidase do veneno de *B. moojeni*, é derivada do peróxido de hidrogênio produzido pela mesma, através da hidrólise de aminoácidos.

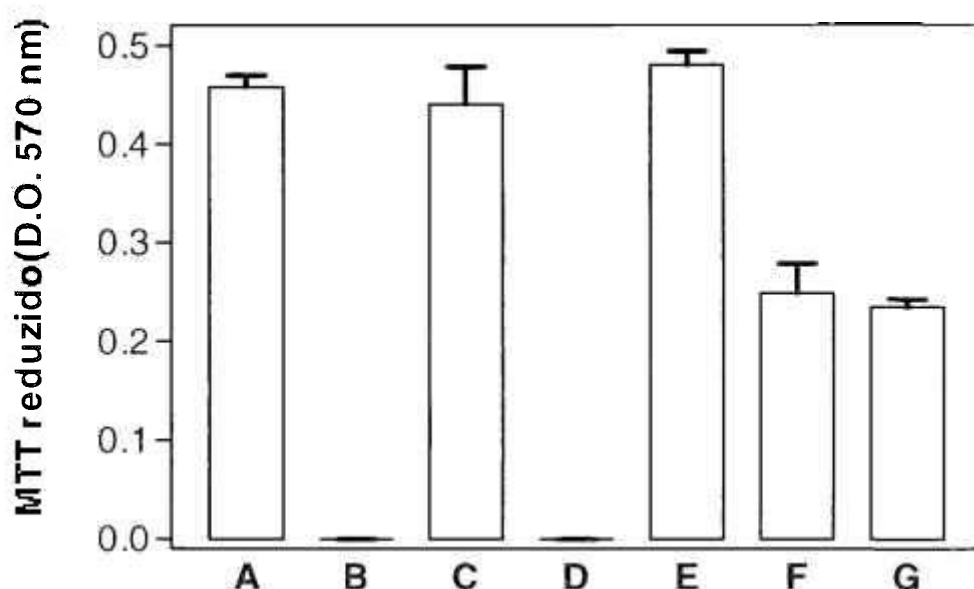


Fig.9 Caracterização da atividade LAO contra promastigotas de *L(L.) amazonensis*. **A** – Promastigotas em meio de cultura RPMI-1640 **B** – Promastigotas em meio RPMI-1640 + H₂O₂ 5 mM **C** – Promastigotas em meio RPMI-1640 + H₂O₂ 5mM + Catalase 0.3 mg/ml **D** – Promastigotas em meio RPMI 1640 + LAO 30 µg/ml. **E**- Promastigotas em meio RPMI-1640 + LAO 30 µg/ml + Catalase 0,3 mg/ml. **F**- Promastigotas em HBSS. **G**- Promastigotas em HBSS + LAO 30 µg/ml. A viabilidade das promastigotas foi expressa como D.O 570 nm do MTT oxidado à formazan. As barras representam a média das quadruplicatas.

4.8- Estudos Ultraestruturais

As promastigotas de *L.(L.)amazonensis* foram incubadas com a LAO purificada do veneno de *B.moojeni*, nas mesmas condições descritas para ensaios de toxicidade (Métodos) e posteriormente processadas e analisadas em microscopia eletrônica. Danos seqüenciais foram observados no citoplasma dos parasitas, conduzindo em seguida à morte dos mesmos. Observou-se nas primeiras 4 horas de incubação, o cinetoplasto mais eletrodense, assim como edema de organelas como mitocôndrias (Fig.10B). Após 8 horas, o edema da membrana nuclear assim como da célula em geral é observado, assim como a perda da condensação da cromatina (Fig.10C). Contudo, os microtúbulos da membrana plasmática mostraram-se ainda preservados. Ao final das 18 horas de incubação, verifica-se a completa destruição das promastigotas, não sendo mais possível uma identificação confiável das estruturas do parasita (Fig.10D). Na Fig.10A pode-se observar promastigotas íntegras, isto é, sem o tratamento com a LAO e portanto, utilizadas como grupo controle.

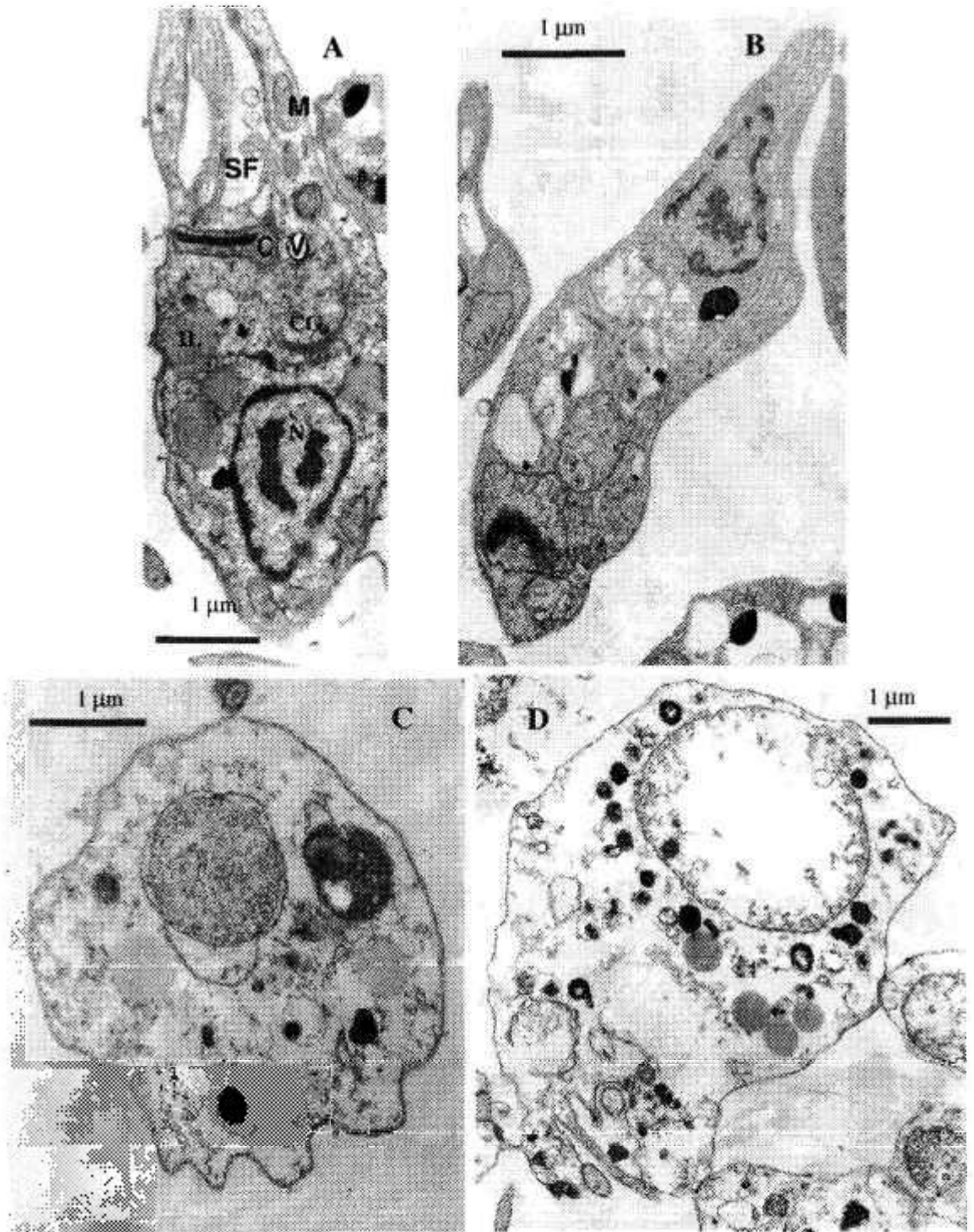


Fig.10 **A-** Promastigotas de *L.(L.)amazonensis* em meio RPMI-1640 sem tratamento com LAO (grupo controle). **B-** Promastigotas de *L.(L.)amazonensis* incubadas em meio RPMI-1640 com LAO por 4 horas. **C-** Incubação por 8 horas. **D-** Incubação por 18 horas. N= núcleo; C= cinetoplasto; IL= inclusões lipídicas; CG= Complexo de Golgi; V= vacúolos; SF= saco flagelar; M= mitocôndrias.

4.9 Ensaio de Toxicidade da LAO

A enzima L-aminoácido oxidase, purificada do veneno de *B. moojeni*, apresentou toxicidade para células LLCMK-2, como observado após sua incubação e posterior ensaio de viabilidade celular (MTT). A LAO nativa, isto é, não tratada com radiação ionizante, apresentou uma C.E.₅₀ de 11 μ g/ml (7,53 μ g/ml-15,70 μ g/ml); a irradiada com dose de 2kGy, mostrou-se mais tóxica, com uma C.E.₅₀ de 6 μ g/ml (4,88 μ g/ml-7,21 μ g/ml), conforme a Fig.11.

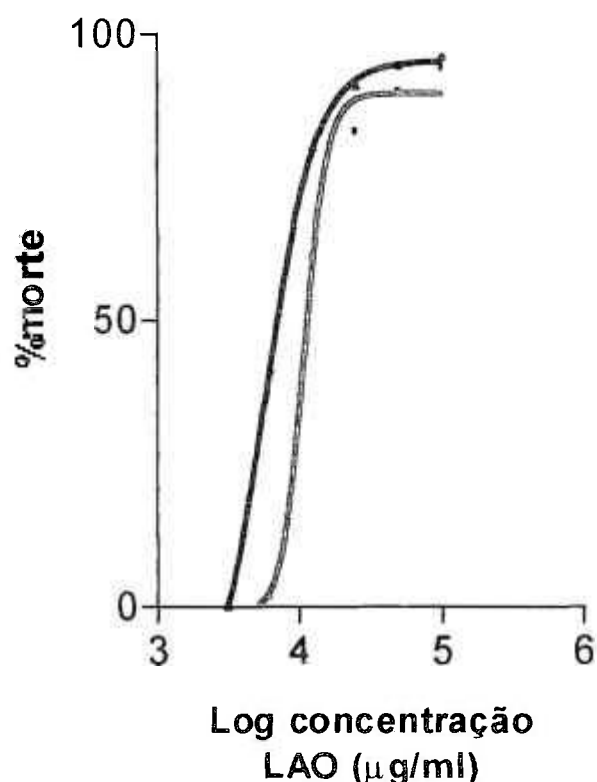


Fig.11 Concentração efetiva 50% da enzima purificada do veneno de *B. moojeni* (LAO) nativa (linha preta) e irradiada na dose de 2kGy (linha vermelha) com raios gama de ^{60}Co , contra células LLCMK-2. A viabilidade celular foi determinada pelo método do MTT. A concentração foi expressa na forma logarítmica (μ g/ml).

Este trabalho demonstrou claramente a atividade antileishmania do veneno de *B.moojeni* sobre este importante patógeno de doença humana, corroborando os dados de FERNANDEZ-GOMES *et al* (1994), que mostraram que o veneno de *Cerastes cerastes* também apresentou a mesma atividade sem entretanto, isolar a fração responsável.

Tratando-se de veneno de serpentes, o uso de complexas misturas protéicas, tem limitações significativas. A concentração efetiva 50% do veneno de *B.moojeni*, foi compatível com uma possível associação a pomadas ou géis para uso tópico, porém, o uso destas misturas poderia causar uma indesejável reação de hipersensibilidade, relacionada a sua alta imunogenicidade (ANDERSON *et al*, 1993). As outras toxinas encontradas no veneno total, sem atividade antileishmania, poderiam prejudicar o paciente, visto que a presença de miotoxinas, fosfolipases, fatores pró-coagulantes e agregadores de plaquetas, foram relatadas no veneno de *B. moojeni* (MOURA-DA-SILVA *et al*, 1990b; FERREIRA *et al*, 1992). Casos de acidentes botrópicos relatam apenas 1% de morte, com maiores complicações descritas a efeitos trombóticos nas extremidades e complicações renais (NISHIOKA & SILVEIRA, 1992).

Portanto, a melhor alternativa para se utilizar o veneno de *B.moojeni* em uma abordagem terapêutica, seria a eliminação destas toxinas, desde que estas não compartilhem a atividade antileishmania.

O rápido processo cromatográfico desenvolvido para purificação da enzima, utilizando-se cromatografia de exclusão molecular seguido de troca iônica,

resultou em uma fração purificada e bastante ativa, sendo esta a única responsável por toda atividade antileishmania no veneno total. Através de ambos processos cromatográficos, foi possível se verificar e confirmar que as mesmas frações apresentando atividade L-aminoácido oxidase, eluíram com as frações de atividade antileishmania. As propriedades bioquímicas da enzima corroboram os dados descritos para L-aminoácido oxidases de venenos de serpentes (AHN *et al*, 1997).

A enzima foi purificada e se apresentou homogênea, como observado em SDS-PAGE, migrando como uma única banda de massa molecular 69kDa na presença de 2-β-mercaptoetanol. A massa molecular determinada para a enzima em condições não denaturantes, isto é, através da cromatografia de exclusão molecular, foi estimada em 140kDa, sugerindo que a mesma ocorre na forma homodimérica no veneno. Esta massa molecular observada para LAO de *B. moojeni*, é similar às descritas para L-aminoácido oxidases de veneno de serpentes, variando de 60kDa como estrutura monomérica a 150kDa como dímero (TAN & SWAMINATHAN, 1992; AHN *et al*, 1997). A mesma estrutura homodimérica encontrada em nossos experimentos, foi também observada para várias L-aminoácido oxidases (PONNUDURAI *et al*, 1994).

Alguns autores descrevem a presença de múltiplas formas da enzima em veneno de serpentes (NAKANO *et al*, 1972; SHAHAM & BDOLAH, 1973), porém, o mesmo resultado não foi observado para LAO de *B. moojeni*. Isoenzimas foram encontradas em veneno de *Trimeresus mucrosquamatus* e *T. flavoviridis* (TAN & SWAMINATHAN, 1992), mas a enzima purificada em nosso laboratório não apresentou resultados compatíveis com as mesmas, como observado em SDS-

PAGE ou isofocalização elétrica, com um ponto isoelétrico estimado em 4.8 . Pontos isoelétricos similares são descritos para LAO de *Lachesis muta muta*, *Trimeresurus mucrosquamatus*, *Calloselasma rhodostoma* e *Ophiophagus hannah* (SÁNCHEZ & MAGALHÃES, 1991; AHN *et al*, 1997, PONNUDURAI *et al*, 1994, UEDA *et al*, 1988). Na análise da enzima em HPLC, foi observado um pico simétrico eluindo concomitantemente com um pequeno pico, sugerindo alguma degradação da amostra, visto que a L-aminoácido oxidase comercial (SIGMA), apresentou diversos picos protéicos. A LAO (SIGMA) também apresentou uma menor atividade antileishmania, com uma concentração efetiva maior que a LAO de *B. moojeni* contra promastigotas de *L.(L.)amazonensis*.

As amostras de LAO, submetidas ao tratamento com radiação ionizante, perderam grande parte de atividade, exceto as irradiadas com dose de 2kGy.

A radiação ionizante pode conferir mudanças nas propriedades biológicas e antigênicas de uma proteína (NASCIMENTO *et al*, 1996), através da alteração de sua estrutura molecular (MOREIRA *et al*, 1997). Entretanto, a irradiação preservou as atividades antileishmania e L-aminoácido oxidase da LAO purificada.

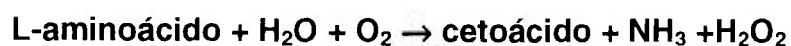
A concentração efetiva 50% (CE₅₀) da enzima purificada contra promastigotas de *L.(L.)amazonensis* foi 3.8 vezes maior que a encontrada para o veneno total. Este resultado foi menor que o esperado, visto que obteve-se uma purificação de 135 vezes, determinado por ensaios enzimáticos. Este comportamento observado para LAO nos ensaios *in vitro* com as promastigotas, poderia ser explicado pela restrição de substrato ou mesmo a outros fatores envolvendo o meio de cultura, afetando a completa ação da enzima, visto que,

especificidade por diferentes substratos já foi observada para L-aminoácido oxidase (PONNUDURAI *et al*, 1994).

As promastigotas de *Leishmania spp* apresentaram diferentes susceptibilidades a ação da enzima, com um CE₅₀ de 1,80µg/ml para *L.(L.) amazonensis*, 0.63µg/ml para *L.(L.)chagasi* e 0.78µg/ml para *L.(V.)panamensis*. Este fato poderia ser explicado pelos diferentes graus de ligação da LAO na membrana citoplasmática das células, como observado por SUHR & KIM (1996), ao incubar LAO de veneno de serpente com variadas linhagens celulares.

Os ensaios da LAO com células LLCMK-2 mostraram que a enzima nativa apresentou uma toxicidade pelo menos 6.1 vezes menor àquela observada para as promastigotas (C.E.₅₀ 11µg/ml). A ligeira discrepância de CE₅₀ da LAO irradiada (C.E.₅₀ 6µg/ml) poderia ser explicada por variações ocasionais como cofatores (FAD). Independentemente da forma, a enzima mostrou-se radioresistente, visto que suas atividades antileishmania e L-aminoácido oxidase permaneceram bastante preservadas na dose de 2kGy.

O mecanismo celular da ação tóxica da LAO após incubação com as promastigotas, utilizando-se diferentes abordagens, mostrou uma forte relação entre a atividade antileishmania e o peróxido de hidrogênio. A enzima catalisa a oxidação deaminativa de L-aminoácidos, produzindo o cetoácido correspondente, peróxido de hidrogênio e amônia (TAN & SAIFUDDIN, 1991; PESSATTI *et al*, 1995), como descrita na reação seguinte:



As promastigotas sobreviveram após incubação da LAO em um meio sem aminoácidos (HBSS), demonstrando desta forma, a dependência do substrato

para a formação do H_2O_2 . Utilizando-se catalase para eliminar a ação do peróxido de hidrogênio, observou-se a completa destruição da atividade antileishmania sugerindo que a ação tóxica no parasita, é derivada da formação deste subproduto enzimático, e não pela ação de um cetoácido ou amônia, que não são afetados pela catalase. Com a adição de H_2O_2 exógeno, observou-se 100% de morte das promastigotas, enfatizando-se assim, a principal ação deste subproduto como efector da atividade antileishmania. AHN *et al* (1997), descrevem a ação da LAO de veneno de serpente em linhagens de células de carcinoma gástrico humano, sugerindo a possível morte destas, à ação do peróxido de hidrogênio.

Os estudos ultraestruturais das promastigotas de *L.(L.)amazonensis*, apresentaram a manutenção da membrana celular, com um intenso edema da célula, especialmente de mitocôndrias. Este fato pode ser atribuído à ação do peróxido de hidrogênio, descrito como forte indutor de edema celular (AHN *et al*, 1997).

O modo de ação do H_2O_2 nas promastigotas ainda não foi completamente elucidado, visto que alguns autores descrevem a indução de apoptose pela ação da L-aminoácido oxidase de veneno de serpentes (TORII *et al*, 1997, SUHR & KIM, 1996). Os dados observados sugerem que a ação principal da enzima é a lise de membrana celular, com alguma semelhança à apoptose de células de mamífero, a qual é induzida por radicais livres como o peróxido de hidrogênio. O estresse oxidativo causado pelo H_2O_2 poderia ativar as “heat shock proteins”, descritas para *Leishmania spp.*(KROBITSCH *et al*, 1998), induzindo atividades proteolíticas dentro da célula, como também afetando funções mitocondriais.

Visto que as duas formas do parasita encontram-se em diferentes ambientes em seus respectivos hospedeiros, são esperadas algumas modificações metabólicas. Constatou-se, através do ensaio de viabilidade celular do MTT, que a enzima L-aminoácido oxidase, purificada do veneno de *B.moojeñi* não conferiu morte às amastigotas de *L.(L.)amazonensis*, baseado em nossas condições experimentais. Este fato pode ser explicado pelas diferenças metabólicas encontradas nas amastigotas, que são capazes de eliminar peróxido de hidrogênio com muito mais eficiência que as promastigotas (MURRAY, 1981, 1982; PEARSON *et al*, 1983). Estes dados demonstram que os mecanismos de proteção contra H₂O₂ das amastigotas, resultam em um importante sistema de escape ou redução dos efeitos letais provocados por metabólitos do oxigênio. Sabendo-se que o H₂O₂ possui uma ação antileishmania comprovada (CHANNON & BLACKWELL, 1985), determinou-se sua concentração efetiva 50% nas amastigotas de *L.(L.)amazonensis* (0,67µg/ml - 0,67-0,68µg/ml).

Alguns autores descrevem que o principal mecanismo de proteção do parasita contra metabólitos gerados a partir do oxigênio, é derivada de um complexo sistema enzimático, visto que catalase, superóxido dismutase, glutathione redutase e glutathione peroxidase são detectadas na forma amastigota (MEHLOTRA, 1996). As formas promastigotas são descritas como deficientes em determinadas enzimas como por exemplo a catalase e a glutathione peroxidase, sendo que 80-95% destas morrem logo após a penetração em células residentes normais do organismo humano. MEHLOTRA, em 1996, descreveu que amastigotas de *L.(L.) donovani* possuem 3 vezes mais catalase e 14 vezes mais glutathione peroxidase que as formas promastigotas.

Portanto, as condições adversas encontradas naturalmente pela *Leishmania spp.* em seu ciclo de vida, conduzem a um aumento da resistência aos efeitos tóxicos gerados pela exposição oxidativa (MEHLOTRA, 1996).

A partir do dados obtidos neste trabalho, observou-se a potencialidade de venenos de serpentes como ferramenta de estudo para o desenvolvimento de novos compostos capazes de inibir protozoários. Para isto, novos estudos devem ser realizados, afim de se verificar as reais condições do uso terapêutico dessas toxinas naturais como armas no combate às doenças tropicais.

6- CONCLUSÕES

1. O veneno total de *B. moojeni*, apresentou atividade antileishmania.
2. A enzima L-aminoácido oxidase revelou-se como a responsável pela morte dos parasitas.
3. A caracterização bioquímica da enzima, mostrou a presença de duas subunidades homogêneas em sua composição.
4. Estudos ultraestruturais das promastigotas, revelaram uma seqüência de eventos ocorridos na célula que levam à morte do parasita.
5. O mecanismo de ação da enzima nas promastigotas foi caracterizado como peróxido de hidrogênio-dependente.
6. A enzima L-aminoácido oxidase comercial (SIGMA) se apresentou menos ativa contra promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis*, quando comparada a LAO de *B. moojeni*.
7. A dose de 2kGy não alterou significativamente a atividade enzimática da LAO.

7- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AHN, M.Y., LEE, B.M. AND KIM, Y.S. Characterization and cytotoxicity of L-amino acid oxidase from the venom of king cobra (*Ophiophagus hannah*). *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* v.29, p.911-919, 1997.
- ALEXANDER, J. & RUSSELL, D.G. Parasite antigens, their role in protection, diagnosis and escape: The Leishmaniasis. *Current Topics in Microbiology and Immunology.* v.20, p. 43-63, 1985.
- ALOOF-HIRSCH, S., DEVRIES, A. and BERGER, A. The direct factor lytic of cobra venom: purification and chemical characterization. *Biochim. Biophys. Acta* v.154, p.53-60, 1968.
- ALVING, C.R., STECK, E.A., CHAPMAN, W.L., WAITS, V.B., HENDRICKS, L.D., SWARTZ, G.M. & HANSON, W.L.. Therapy of Leishmaniasis: Superior effecacies of liposome-encapsulated drugs. *Proc. Natl. Acad. Sci.* v.75, p.2959-2963, 1978.
- AMARAL,C.F.S.; DOURADO,H.V.; KOUYOUMDJIAN,J.A.; CARDOSO,J.R.; CAMPOS,J.A.; AZEVEDO-MARQUES,M. & LOPES,P.F.A.-*Manual de diagnóstico e tratamento de acidentes ofídicos.* Brasília, Centro de Documentação do Ministério da Saúde, p.53, 1987.
- ANDERSON,S.G., GUTIERREZ, J.M. AND OWNBY, C.L. Comparison of the immunogenicity and antigenic composition of ten Central American snake venoms. *Toxicon.*v. 31(8), p.1051-1059, 1993.

- ARAGON-ORTIZ, F. & GUBENZEC, F. Characterization of a metalloproteinase from *Bothrops asper* (terciopelo) snake venom. *Toxicon*, v. 25, p.759-766, 1987.
- ARAÚJO, M.F.L. Investigação e isolamento de Leishmania: Criopresentação de amostras de biópsias de lesões cutâneas na Leishmaniose tegumentar experimental. *Rev. Inst. Adolfo Lutz*. v.53(1,2), p.81-84, 1993.
- ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. & MANDELBAUM, F.R. Comparison of immunological, biochemical and biophysical properties of three hemorrhagic factors isolated from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*, v.24 (9), p.943-946, 1986.
- BALANA-FOUCE, R., REGUERA, R.M., CUBRÍA, C. & ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of Leishmaniasis. *Gen. Pharmac.* v.30, p.435-443, 1998.
- BALANCO, J.M.F.; PRAL, E.M.F.; DA SILVA, S.; BIJOVSKY, A.T. MORTARA, R.A. & ALFIERI, S.C. Axenic cultivation and partial characterization of *Leishmani brasiliensis* amastigote-like stages. *Parasitology*. v.116, p.103-113, 1998.
- BARRAVIRA, B.. *Venenos animais: uma visão integrada*. Editora de Publicações Científicas, Rio de Janeiro, 1994.
- BERMAN, J.D. & WYLER, D.J. An in vitro model for investigation of Chemotherapeutic agents in Leishmaniasis. *J. Inf. Diseases*. v.142(1), 1980.
- BERMAN, J.D. Chemotherapy for Leishmaniasis: biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. *Rev. Infect. Dis*. v.10, p.560-586, 1988.
- BERMAN, J.D., WADDELL, D. & HANSON, B.D. Biochemical mechanisms of Antileishmanial activity of sodium stibogluconate. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy*. June, p.916-920, 1985.

- BJARNASON, J.B. AND FOX, J.W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. *J. Toxicol.-Toxin* –review, v.7, p.121-209, 1988.
- BRADFORD, M.M. A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal. Biochem.*, v.72, p.248-253, 1976.
- BRAZIL, O.A. IN: CORBETT, C.E., ed. *Farmacodinâmica*. Rio de Janeiro, Guanabara Koogan, cap. 71, p.1044-1074, 1982.
- BUTLER, J., LAND, E.J. & SWALLOW, A.J. Chemical mechanisms of the effects of high energy radiation on biological systems. *Radiat. Phys. Chem.* p.273-282, 1984.
- CARDOSO, J.L.C. & BRANDO,R.J. *Acidentes por animais peçonhentos:clínica e tratamento*.São Paulo, Editora Santos,1982.
- CHANNON, J.Y., AND BLACKWELL, J.M. A study of the sensitivity of *Leishmania donovani* promastigotes and amastigotes to hydrogen peroxide. I. Differences in sensitivity correlate with parasite-mediated removal of H₂O₂. *Parasitology*. v.91, p.197-206, 1985.
- CHAPMAN, J.D. Radiation chemical studies with nitrofurazone as related to its mechanism of radiosensitization.. *Radiat Res.* v.53(2), p.190-203, 1973.
- CHIPPAUX,J.P.; WILLIAM,V. & WHITE,J. Snake venom variability:methods of study, results and interpretation. *Toxicon*. v.29, p.1279-1303, 1991.
- DENSON, K.W.E. & ROUSSEAU, W.E. Separation of coagulant components of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. v.8, p.15-18, 1970.
- DENSON,K.W.E.-Coagulant and anticoagulant action of snake venoms.*Toxicon*.v.7, p.5-11, 1969.

- DENSON, K.W.E.; RUSSEL, F.E.; ALMAGRO, D. & BISHOP, R.C. Characterization of the coagulant activity of some snake venoms. *Toxicon*. v.10, p.557-562, 1972.
- DEVI, A. *The protein and nonprotein constituents of snake venoms in venomous animals and their venoms*, Eds. Bucherl, W.; Buckley, E & Deulofen, V., Academic Press, New York. 1968.
- DIETZE, R., ARAÚJO, R., LIMA, M.L.R., VEXENAT, J.A., MARSDEN, P.D. & BARRETO, A.C. Ensaio terapêutico com Glucantime em saguis (*Callithrix jacchus*) infectados com uma cepa de *Leishmania donovani* aparentemente resistente ao tratamento. *Revista da Sociedade Brasileira de Medicina Tropical*. v.18(1), p.39-42, 1985.
- FERNANDEZ-GOMES, R., ZERROUK, H., SEBTI, F., LOYENS, M., BENSLIMANE, A. AND OUAISSI, M.A. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cetrastes* venom which interact with the parasites. *Toxicon*. v.32(8), p.875-882, 1994.
- FERREIRA, M.L., MOURA-DA-SILVA, A., FRANÇA, F.O.S., CARDOSO, J.L. AND MOTA, I. Toxic activities of venoms from nine *Bothrops* species and their correlation with lethality and necrosis. *Toxicon*. v.30(12), p.1603-1608, 1992.
- FLOWERS, H.H. The effects of X-radiation on the biological activity of Cottonmouth Moccasin (*Akistrodon Piscivorus*) venom. *Toxicon*. v.1, p.131-136, 1963.
- FURTADO, M.F.D.; MARUYAMA, M.; KAMIGUTI, A.S. & ANTONIO, L.C. Comparative study of nine *Bothrops* snake venoms from adult female snakes and their offspring. *Toxicon*., v.29, p.219-226, 1991.

- FURUKAWA, Y. & HAYASHI, K. Factor X converting and trombin-like activities of *Bothrops jararaca* venom. *Toxicon*. v.15 (2), p. 107-114, 1977.
- GREENSTOCK, C.L.. Redox processes in radiation biology and cancer. *Radiat Res*. v.86(2), p.196-211, 1981.
- GROSH, D.S. & HOPYWOOD, L.E. *Biological effects of radiation*. New York, N.Y. Academic Press. 1979.
- GROTTO, M.; MOROZ, C.; de VRIEZ, A. & GOLDBLUM, N. Isolation of *Vipera palestinae* hemorrhagin of and distinction between its hemorrhagic and proteolytic activities. *Biochem. Biophys. Acta*. v.133, p. 356, 1967.
- GUARNIERI, M.C. *Estudo dos Efeitos da Radiação Gama de ⁶⁰Co nas propriedades bioquímicas, biológicas e imunológicas do veneno de Bothrops jararaca*. São Paulo, 1992. Tese (Doutorado)- Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- GUTIERREZ, J.M. & LOMONTE, B.-Local tissue damage induced by *Bothrops* snake venoms. A review. *Mem. Inst. Butantan*. v.51, p.211-223, 1989.
- HOGUE, A.R. & ROMANO-HOGE, S.A.R.W.L. Sinopse das serpentes peçonhentas do Brasil- 2ª edição. *Mem. Inst. Butantan*. v.42/43, p.373-499, 1979.
- IWANAGA, S. & SUZUKI, T. *Enzymes in snake venoms* In : LEE, C.Y., ed. *Handbook of Experimental Pharmacology*. Berlin, Springer-Verlag, .v.52, p.61-158, 1979.
- JORGE, M.T. & RIBEIRO, L.A. Acidentes por serpentes peçonhentas do Brasil. *Ver. Ass. Med. Brasil*, v.36(2), p.66-77, 1990.
- KAISER, E. & MICHEL, H.- *Chemistry of pharmacology of the venoms of Bothrops and Lachesis*. In: BUCHERL, W.; BUCKLEY, E. & DELOFEU, V., eds.

- Venomous animals and their venoms. New York, Academic. Press Inc.,. v.2, ch.32, p.307-318, 1971.
- KAMIGUTI,A.S.; CARDOSO,J.L.C.; THEAKSTON,R.D.G.; SANO-MARTINS, I.S.;HUTTON,R.A.;RUGMAN,F.P.; WARREL,D.A. & HAY,C.R.M. Coagulopathy and haemorrhage in human victims of *Bothrops jararaca* envenoming in Brazil. *Toxicon*. v.29, p.961-972, 1991.
- KROBITSCH, S., BRANDAU, S., HOYER, C., SCHMETZ, C., HUBEL, A. AND CLOS, J. *Leishmania donovani* heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. *J Biol Chem*. v.13(11), p.6488-94, 1998.
- LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. *Nature*. v.227, p.680-685, 1970.
- LATARJET, R. Rads and Gray – Becquerels and Curies. *Radiat. Res*. v.141, p.105-107, 1995.
- LOUZIR, H., MELBY,P.C., SALAH, A.B., MARRAKCHI, H., AOUN, K., ISMAIL, R.B. & KOUSSAY, D.. Immunologic determinants of disease evolution in localized cutaneous leishmaniasis due to *Leishmania major*. *J.Infec. Diseases*. v.177, p.1687-95, 1998
- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Some physical and biochemical characteristics of HF2, one of the hemorrhagic factors in the venom of *Bothrops jararaca*. In: OHSAKA, A.; HAYASHI, K. & SAWAI, Y., eds. *Animal, Plant and Microbial Toxins*. Plenum Press, London,. v.1, p. 111-121, 1976.

- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Isolation and characterization of a proteolytic enzyme from the venom of the snake *Bothrops jararaca*. *Toxicon*, 20 (6) :955-972, 1982.
- MANDELBAUM, F.R.; REICHL, A.P. & ASSAKURA, M.T. Hemorrhagic factors from venoms of two species of *Bothrops* snakes. In: ACIESP. Toxinas protéicas: anais do XII Simpósio Anual da ACIESP realizado em Campinas, 1988. Campinas, 1988. Pub.57-I, v.1, p. 9-14.
- MANDELBAUM, F.R.; SERRANO, S.M.T.; SAKURADA, J.K.; RANGEL, H.A. & ASSAKURA, M.T. Immunological comparison of hemorrhagic principles present in venoms of the *Crotalinae* e *Viperinae* subfamilies. *Toxicon*, v.27 (2), p.169-177, 1989.
- MARTÍNEZ, S. & MARR, J.J. Allopurinol in the treatment of American cutaneous leishmaniasis. *N.Engl. J. Med.* 326, p.741-744, 1992.
- MEHLOTRA, R.K. Antioxidant defense mechanisms in parasitic protozoa. *Critical Reviews in Microbiology*. v.22(4), p.1-295-314, 1996.
- MENEZ, A. Les structures des toxines des animaux venimeux. *Pour Sci.* v.190, p.34-40, 1993.
- MOREIRA, E.G., NASCIMENTO, N., ROSA, G.J.M., ROGERO, J.R., & VASSILIEF, V.S. Effect of gamma radiation on the behavioral properties of crotoxin. *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. V.30, p.245-249, 1997.
- MORI, N.; NIKAI, T.; SUGIHARA, H. & TU, A.T. Biochemical characterization of hemorrhagic toxins with fibrinogenase activity isolated from *Crotalus ruber ruber* venom. *Arch. Biochem. Biophys.* v.253, p.108, 1987.

- MOURA-DA SILVA, A.M.; DESMOND, H.; LAING, G. & THEAKSTON, R.D.G. Isolation and comparison of myotoxins isolated from venoms of different species of *Bothrops* snakes. *Toxicon*. v.29(6), p.713-723, 1991.
- MOURA-DA-SILVA, A., CARDOSO, D.F. AND TANIZAKI, M. Differences in distribution of myotoxic proteins in venoms from different *Bothrops* species. *Toxicon*. v.28(11), 1293-1301, 1990.
- MOURA-DA-SILVA, A.M., LIMA, M.R.D., NISHIKAWA, A.K., BRODSKY, C.I., SANTOS, M.C., FURTADO, M.F.D., SILVA, W.D. & MOTA, I. Antigenic cross-reactivity of venoms obtained from snakes of genus *Bothrops*. *Toxicon*. v.28, p.181-188, 1990.
- MURRAY, H.W. Susceptibility of *Leishmania* to oxygen intermediates and killing by normal macrophages. *Journal of Experimental Medicine*. v.153, p.1302-1315, 1981.
- MURRAY, H.W. Cell-mediated immune response in experimental visceral leishmaniasis. II. Oxygen-dependent killing of intracellular *Leishmania donovani* amastigotes. *Journal of Immunology*. v.129, p.351-357, 1982.
- NAHAS, L.; KAMIGUTI, A.S. & BARROS, M.A.R. Thrombin-like and factor X activator components of *Bothrops* snake venoms. *Thrombosis and Haemostasis*, v.2, p.314-328, 1979.
- NAKANO, K., INAMAS, Y., HAGIHARA, S. & OBO, F. Isolation and properties of L-amino acid oxidase in habu snake (*Trimeresurus flavoviridis*) venom. *Acta Med. Univ. Kagoshima*. v.14, p.229-239, 1972.

- NASCIMENTO,N.; SEEBART,C.S.; FRANCIS,B.; ROGERO,J.R.; KAISER,I.I.
Influence of ionizing radiation on crotoxin: *Biochemical and immunological aspects* *Toxicon*, v.34(1), p.123-131, 1996.
- NISHIOKA S.A. AND SILVEIRA, P.V. A clinical and epidemiologic study of 292 cases of lance-headed viper bite in a Brazilian teaching hospital. *Am J Trop Med Hyg.* v.47(6), p.805-810, 1992.
- NUNES, A.C., ALMEIDA-CAMPOS, F.R., HORTA, M.F. & RAMALHO-PINTO, F.J.
Leishmania amazonensis promastigotes evade complement killing by interfering with the late steps of the cascade. *Parasitology.* v.115, p.601-609, 1997.
- OHSAKA, A.-*Hemorrhagic, necrotizing and edema-forming effects of snake venoms.* In *Snake Venoms*, p. 480, Ed. Lee,Y., Springer-Verlag, Berlin, Heidelberg & New York , 1979.
- OUYANG,C.;TENG,C.M. & HUANG,T.F.-Characterization of snake venom principles affecting blood coagulation and platelet aggregation. *Asia Pacific J. Pharm.* v.2, p.169-179, 1987.
- OVADIA,M. Isolation and characterization of three hemorrhagic factors from the venom of *Vipera palestinae*. *Toxicon*, v.16, p.479-487, 1987.
- PAUL, M., DURAND, R., FESSI, H., RIVOLLET, D., HOUIN, R., ASTIER, A. & DENIAU, M.. Activity of a new liposomal formulation of Amphotericin B against two strains of *Leishmania infantum* in a murine model. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* v.41, p.1731-1734, 1997.

- PEARSON, R.D., HARCUS, J.L., ROBERTS, D. AND DONOWITZ, G.R. differential survival of *Leishmania donovani* amastigotes in human monocytes. *Journal of Immunology*. v.131, p.1994-1999, 1983.
- PESSATTI, M.L., FONTANA, J.D., FURTADO, M.F.D., GUIMARÃES, M.F., ZANETTE, L.R.S., COSTA, W.T. AND BARON, M. Screening of *Bothrops* snake venoms for L-amino acid oxidase activity. *Applied Biochemistry and Biotechnology*. V.51/52, p.197-210, 1995.
- PETERS, W. AND KILLICK-KENDRICK, R. *The Leishmaniasis in Biology and Medicine*, vol 1, Academic Press Inc., London, 1987.
- PONNUDURAI, G., CHUNG, M.C.M. AND TAN, N-H. Purification and properties of L-amino acid oxidase from malayan pit viper (*Calloselasma rhodostoma*) venom. *Arch. Biochem. Biophysics*. v.313, p.373-378, 1994.
- QUEIROZ, L.S.; SANTO-NETO, H.; ASSAKURA, M.T.; REICHL, A.P. & MANDELBAUM, F.R. Pathological changes in muscle caused by hemorrhagic and proteolytic factors from *Bothrops jararaca* snake venom. *Toxicon*. v.23(2), p.341-345, 1985.
- RANG, H.P., DALE, M.M. *Pharmacology*. Longman Group Limited, Livingstone, London, 1991.
- ROGERO, J.R. & NASCIMENTO, N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation *J. Venom. Anim. Toxins*, v.1(1), p.7-10, 1995.
- ROSENFELD, G. Reprinted from: MATTOS, A.G. *Emergências em Pediatria* . - *Acidentes por animais peçonhentos*. 2^a ed. São Paulo, Sarvier, 1967.

- ROSENFELD, G. *Symptomatology, pathology and treatment of snake bites in South America* In *Venomous Animals and Their Venoms*, Eds. Bucherl, W.; Buckley, E & Deulofen, V., Academic Press, New York, v.2, 1971.
- SALAFRANCA, E.S. Irradiated cobra (*Naja naja philippinensis*) venom. *Int J Appl Radiat Isot.* Jan; v.24(1), p.60, 1973.
- SÁNCHEZ, E.O.F. AND MAGALHÃES, A. Purification and partial characterization of an L-amino acid oxidase from bushmaster snake (surucucu pico de jaca) *Lachesis muta muta* venom. *Brazilian J. Med. Biol. Res.* v.24, p.249-260, 1991.
- SANCHEZ, E.F.; MAGALHÃES, A. & DINIZ, C.R. Purification of a hemorrhagic factor (LHF-1) from the venom of bushmaster snake *Lachesis muta muta*. *Toxicon.* v.25, p.611-619, 1987.
- SERENO, D. & LEMESRE, J-L. Axenically cultured amastigote forms as an in vitro model for investigation of antileishmanial agents. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy.* v.41, p.972-976, 1997.
- SHAHAM, N. & BDOLAH, A.. L-amino acid oxidase from *Vipera palaestinae* venom: purification and assay. *Com. Biochem. Physiol.* V.46B, p.691-698, 1973.
- SKALKA, M.; ANTONI, F. *Effect of radiation on the biological properties of proteins.* In: *Radiation Sensitivity of Toxins and Animal Poisons*, Bangkok., Viena, 1969.
- SKARNES, R. C. L-amino acid oxidase, a bacterial system. *Nature.* v.225, p.1072-1073, 1970.
- SKIENS, W.E.. Sterilizing radiation effects on selected polymers. *Tadiat. Phys. Chem.* v.15, p.47-57, 1980.

- SPENCER, P.J. *Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de Bothrops jararacussu irradiado com ⁶⁰Co*. São Paulo, 1995. Dissertação (Mestrado) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
- SPIERKEMAN, A.M.; FREDERICKS, K.K.; WAGNER, F.W. & PRESCOTT, J.M. *Leucostoma* peptidase A: A metalloprotease from snake venom. *Biochem. Biophys. Acta*. v.293, p.464-475, 1973.
- STILES, B. G., SEXTON, F. W. AND 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, p.1129-1141, 1991.
- SUHR, S.M. AND KIM, D.S. Identification of the snake venom substance that induces apoptosis. *Bio. Biophys. Res. Communications*.v.224, p.134-139, 1996.
- TADA, H., SHIHO, O., KUROSHIMA, K., KOYAMA, M. AND TSUKAMOTO. An improved colorimetric assay for interleukin 2. *Journal of Immunological Methods*. v.93, p.157-165, 1986.
- TAN, N.T. AND SAIFUDDIN, M.N. Substrate specificity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. *Int. J. Biochem*. v.23, p.323-327, 1991.
- TAN, N-H. AND SWAMINATHAN, S. Purification and properties of L-amino acid oxidase from monocellate cobra (*Naja naja kaouthia*) venom. *Int. J. Biochem*. v.24, p.967-973, 1992.

- TANIZAKI, M.M.; ZINGALI, R.B.; KAWASAKI, H.; IMAJOH, S.; YAMAZAKI, S. & SUZIKI, K. Purification and some characteristics of a zinc metalloprotease from the venom of *Bothrops jararaca* (jararaca). *Toxicon*. v.27(7), p.747-755, 1989.
- TORII, S., NAITO, M. AND TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis-inducing factor with L-amino acid oxidase activity purified from western diamondback rattlesnake venom. *J. Biol. Chem.* v.272, p.9539-9542, 1997.
- TU, A.T. -Hemorrhagic proteases from snake venom . in PIRKLE, H.; MARKLAND Jr, F.S., eds. Hemostasis and animal venoms. v.7, p.425-443, 1985.
- UEDA, M., CHANG, C.C. AND OHNO, M.. Purification and characterization of L-amino acid oxidase from the venom of *Trimeresurus mucrosquamatus* (Taiwan Habu Snake). *Toxicon*. v.26(8), p.695-70, 1988.
- ZWILLING, B.S. & EISENSTEIN, T.K. *Macrophage-Pathogen Interactions*. Marcel Dekker, Inc. cap. 26, New York, 1994.