



AUTARQUIA ASSOCIADA À UNIVERSIDADE
DE SÃO PAULO

**AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DIFERENTES VENENOS
DE SERPENTES, NATIVOS OU IRRADIADOS, COM
RADIAÇÃO GAMA DE ^{60}Co , QUANTO AO PODER
INIBITÓRIO DO CRESCIMENTO DE
*Leishmania (Leishmania) amazonensis***

CECILIA DE OLIVEIRA LOURENÇO

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
2000**

INSTITUTO DE PESQUISAS ENERGÉTICAS E NUCLEARES

Autarquia associada à Universidade de São Paulo

**“AVALIAÇÃO DA ATIVIDADE DE DIFERENTES VENENOS DE
SERPENTES, NATIVOS OU IRRADIADOS, COM RADIAÇÃO GAMA
DE ^{60}Co , QUANTO AO PODER INIBITÓRIO DO CRESCIMENTO DE
Leishmania (Leishmania) amazonensis ”**

CECILIA DE OLIVEIRA LOURENÇO



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

Orientadora: Dra. Nanci do Nascimento

São Paulo

2000

SUMÁRIO

1 Introdução	01
1.1 A Leishmaniose	01
1.1.1 Classificação e Aspectos Clínicos	01
1.1.2 O Ciclo do parasita	05
1.1.3 Epidemiologia.	07
1.1.4 Tratamento.	08
1.1.4.1 Fármacos de Primeira Escolha.	08
1.1.4.2 Fármacos de Segunda Escolha.	08
1.1.4.3 Formas Alternativas de Tratamento.	09
1.2 Os Venenos de Serpentes	13
1.3 A Radiação Ionizante	17
2 Objetivos	22
2.1 Gerais.	20
2.2 Específicos	20
3. Materiais e Métodos	21
3.1 Materiais	21
3.1.1 Venenos Ofídicos	21
3.1.2 Parasitas	22
3.1.3 Células	22
3.1.4 Fonte de Radiação	22
3.1.5 Reagentes	22
3.2 Métodos	23
3.2.1 Cultivo de Parasitas	23
3.2.1 Dosagem de Proteínas	23
3.2.3 Irradiação de Venenos	24
3.2.4 Viabilidade de Parasitas incubados com Venenos Nativos e Irrradiados:	24
3.2.4.1 Determinação das CE ₅₀ dos venenos com atividade antileishmania.	26
3.2.4.2 Viabilidade de parasitas em meio de cultura sem aminoácidos	26
3.2.4.3 Viabilidade após a incubação dos parasitas com Venenos Nativos em presença da enzima Catalase	27
3.2.4.4 Curva Padrão de morte de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> com H ₂ O ₂	27
3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de venenos nativos e irradiados	28
3.2.6 Atividade L-aminoácido oxidase(L-AO)	28
3.2.7 Toxicidade dos venenos com atividade anti- <i>Leishmania</i> em células de mamíferos	29
3.2.7.1 Cultivo das Células LLC- MK ₂ .	29
3.2.7.2 Contagem	30
3.2.7.3 Incubação das células com venenos	30
3.2.7.4 Viabilidade após a incubação das células LLC-MK ₂ com venenos nativos em presença da enzima catalase	31
4 Resultados	32
4.1 Triagem da ação de venenos nativos em <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> .	32
4.2 Determinação da CE ₅₀ dos venenos com atividade antileishmania.	34
4.3 Toxicidade dos venenos nativos e irradiados em células	37
4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de venenos nativos	40
4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS- PAGE de venenos nativos e irradiados.	42
4.6 Atividade L- aminoácido oxidase(L-AO)	47
4.7 Viabilidade de parasitas em meio de cultura sem aminoácidos.	49
4.8 Viabilidade de parasitas em presença da enzima catalase	51
4.9 Curva de morte de <i>Leishmania (Leishmania) amazonensis</i> provocada por peróxido de hidrogênio	59
5 Discussão	60
6 Conclusões	71
7 Referências Bibliográficas	73

Gostaria de dedicar este trabalho à minha
mãe Lisete, que tanto me incentivou ao estudo.

Agradecimentos

Gostaria de agradecer primeiramente a Deus pela oportunidade de realizar este trabalho.

Gostaria de agradecer à minha querida orientadora pelo incentivo, ensinamentos e paciência.

Ao Dr. Heitor Franco de Andrade Júnior pelo apoio e ensinamentos.

Ao Dr. Paulo Cotrim pelas sugestões.

Ao IPEN e ao IMTSP- FMUSP.

Ao CNPq pelo apoio financeiro.

Aos amigos do IMT: Margoth, Luciana, Miriam, Roberto, Andrés, Rose, Bel e Dona Fran por me agüentarem durante este tempo.

Ao amigo André G. Tempone pelos ensinamentos e amizade durante todo o percurso do projeto.

Aos amigos do grupo de venenos do IPEN.

Às amigas Márcia, Elaine, Patrícia e Miriam pelo incentivo e sugestões.

À Dra. Monamaris M. Borges pelos ensinamentos de cultura celular.

À amiga Débora pelas discussões em grupo e pelo ensinamento de cultura de macrófagos.

À amiga Marilda pelos ensinamentos de cultura celular e pelas caronas de volta à São Bernardo.

Ao amigo Patrick J. Spencer, por me mostrar o mundo da pesquisa.

Ao amigo Bruno A. Cardi pela sua contribuição intelectual.

Aos colegas do Gammacell Beth e Carlos.

À minha querida família: meu pai Pedro e sua esposa Tita, às minhas queridas irmãs Deca e Mariana, à minha avó Esmeralda e especialmente à minha mãe e seu marido Edison por compartilharem todos os momentos de dificuldade e alegria.

ABREVIATURAS

AIDS – Síndrome da Imunodeficiência Adquirida

ATP – Adenosina Trifosfato

BOD - Biological Oxygen Demand

CE₅₀ – Concentração Efetiva que inibe 50% do crescimento das células.

D.O. – Densidade Óptica

HBSS – Hank's Balanced Salt Solution

L-AO – L- aminoácido oxidase

MTT - 3-[4,5-Dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyltetrazolium bromide

OPD – Ortho-Phenylenediamine

PLA₂ – Fosfolipase A₂

SDS – PAGE - Sodium Dodecyl Sulfate – Polyacrilamide Gel Electrophoresis

WHO – World Health Organization

“ Avaliação da atividade de diferentes venenos de serpentes, nativos ou irradiados, com radiação gama de ⁶⁰Co quanto ao poder inibitório do crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*”

CECILIA DE OLIVEIRA LOURENÇO

RESUMO

A leishmaniose cutânea é uma doença causada por parasitas do gênero *Leishmania*, que ocorre freqüentemente em países das regiões tropicais e subtropicais. Caracteriza-se por lesões de pele, que podem evoluir para um estágio mais avançado até adquirir um aspecto desfigurante. O seu tratamento consiste basicamente de poucos fármacos como os antimoniais e a pentamidina, que além de apresentarem efeitos colaterais importantes, muitas vezes são ineficazes devido à aquisição de resistência pelo parasita. Busca-se formas alternativas de tratamento desta doença utilizando por exemplo, componentes provenientes de fontes naturais como os venenos de serpentes. Estudos anteriores já demonstraram que componentes isolados de venenos de algumas espécies de serpentes apresentaram inibição do crescimento de certos parasitas incluindo o gênero *Leishmania*. Embora os venenos de serpentes apresentem elevada toxicidade, diferentes métodos têm sido descritos para destoxicar certos componentes, sendo que a destoxicação através da radiação gama tem mostrado resultados favoráveis.

Venenos de serpentes nativos e irradiados foram testados quanto à capacidade de inibição do crescimento de parasitas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e de células de mamíferos da linhagem LLCMK₂, além de caracterizados por testes enzimáticos e por eletroforese. Foram ativos os venenos das espécies *Acanthophis antarcticus*, *Agkistrodon bilineatus*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops jararaca*, *Hoplocephalus stephensi*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colletti*, *Pseudechis guttatus*, *Pseudechis porphyriacus*, sendo inativos os de *Pseudonaja textilis*, *Notechis ater niger*, *Notechis scutatus*, *Oxyuranus microlepidotus* e *Oxyuranus scutellatus*. Após a irradiação com 2 KGy de radiação gama de Cobalto-60, houve perda significativa da atividade da maioria dos venenos. Observou-se que venenos com atividade antileishmania também apresentaram atividade enzimática de L-aminoácido oxidase (L-AO) e que os mesmos possuíam uma proteína em comum com peso molecular em torno de 60kDa, indicando que provavelmente a atividade L-AO está relacionada com o efeito leishmanicida encontrado nestes venenos.

**“Activity evaluation from different native or irradiated with ^{60}Co gamma rays
snake venoms and their inhibitory effect on *Leishmania*
(Leishmania)amazonensis”**

CECILIA DE OLIVEIRA LOURENÇO

ABSTRACT

Cutaneous leishmaniasis is a disease, caused by *Leishmania* parasites, that occurs frequently in tropical and sub-tropical regions of the world. Skin lesions that could result in disfiguring aspect characterize it. The treatment is based on few drugs as antimony salts or pentamidine that are toxic with increasing resistance by the parasite. Alternative forms of disease treatment are in constant search, including natural components as snake venoms. Previous studies demonstrate that some components of snake venoms have an inhibitory effect against those parasites, including *Leishmania* species. Although snake venoms presented high toxicity, several methods have been described to detoxify most or some of their toxic components, with favorable results by the use of gamma irradiation.

In this report, we tested several native and irradiated snake venoms, for inhibitory effect against *Leishmania (Leishmania) amazonensis* parasite and LLCMK₂ mammalian cells, with enzymatic tests and electrophoresis. There are significant activity in *Acanthophis antarcticus*, *Agkistrodon bilineatus*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops jararaca*, *Hoplocephalus stephensi*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colletti*, *Pseudechis guttatus* and *Pseudechis porphyriacus*, venom being inactive *Pseudonaja textilis*, *Notechis ater niger*, *Notechis scutatus*. *Oxyuranus microlepidotus* and *Oxyuranus scutellatus* venoms. After 2K Gy of ^{60}Co irradiation most venom loses significantly their activity.

Venoms with antileishmanial activity presented L-amino acid oxidase (L-AO) activity and showed common protein with a molecular weight about 60kDa in SDS-PAGE. These results indicate that L-AO activity in those venoms are probably related with antileishmanial effect.

1.1. A LEISHMANIOSE

1.1.1 Classificação e Aspectos Clínicos

A leishmaniose pode ser definida como um grupo de doenças causadas por espécies do gênero *Leishmania*, um protozoário que pertence à ordem *Kinetoplastida*, da família *Trypanosomatidae* (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998), sendo transmitida por insetos do gênero *Phlebotomus* no Velho Mundo e *Lutzomyia* no Novo Mundo (ALEXANDER & RUSSEL, 1985).

A classificação do gênero *Leishmania* em diferentes espécies baseou-se inicialmente nos aspectos clínicos, comportamento do vetor e distribuição geográfica (LAINSON & SHAW, 1987). Porém, critérios moleculares, adotados recentemente, fizeram com que o gênero fosse subdividido em dois subgêneros: o subgênero *Viannia* que é encontrado somente no Novo Mundo e o subgênero *Leishmania*, que inclui espécies patogênicas do Velho Mundo e do Novo Mundo (BRITO *et al*, 1998).

As diferentes manifestações clínicas da doença dependem de um complexo de interações entre a capacidade de invasão do parasita, o tropismo e a patogenicidade relacionada à imunogenicidade do hospedeiro (GARNHAN, 1987). Outros fatores como a distribuição geográfica também estão relacionados aos aspectos clínicos da leishmaniose (LAINSON & SHAW, 1987).

De um modo geral, a doença pode apresentar diferentes manifestações clínicas que estão relacionadas com a espécie de *Leishmania*:

- **Leishmaniose visceral ou Calazar:** é o mais grave de todos os tipos de leishmaniose sendo freqüentemente fatal quando não é tratada. Os sintomas iniciais da doença incluem febre, hemorragias, anorexia, sudorese, fraqueza e emagrecimento. Estes sintomas podem aparecer após o período de incubação que varia de 1 a 5 meses, sendo que estágios mais avançados da doença são caracterizados por outros sintomas, como a esplenomegalia, a hepatomegalia, linfadenopatia e a anemia (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998).

Atualmente, o calazar está diretamente associado com doenças que comprometem o sistema imune, como por exemplo a AIDS (Síndrome da Imunodeficiência Adquirida) e com casos de pacientes tratados com corticoesteróides e prednisona, aparecendo assim como uma doença oportunista (ALVAR *et al*, 1992).

- **Leishmaniose cutânea:** caracteriza-se por uma variedade de lesões de pele no local onde o parasita foi inoculado pelo transmissor. Essas lesões podem ser inicialmente do tipo pápula eritematosa ou erupções ulcerosas. Quando encontram-se em seus estágios mais evoluídos, podem persistir por meses ou anos, de acordo com a eficácia do tratamento ou evoluírem para a cura originando cicatrizes características (PEARSON & SOUSA, 1995). O período de incubação geralmente é de 1 semana a 2 meses, dependendo da virulência do parasita (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998). Sua principal característica é constituir uma zoonose e ocorrer freqüentemente em países da América Latina (PEARSON & SOUSA, 1995).

- **Leishmaniose cutânea difusa:** é uma complicação rara da leishmaniose cutânea e está relacionada à deficiência do sistema imunológico do paciente. O início da doença é caracterizado por uma lesão cutânea regular e ulcerosa, que depois evolui para múltiplas lesões não-ulcerativas e nódulos ou placas nas áreas frias do corpo, podendo atingir linfonodos e nasofaringe. A disseminação da doença ocorre através da migração de parasitas por vasos linfáticos ou até mesmo por macrófagos parasitados (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998).

- **Leishmaniose mucocutânea ou Espundia:** inicia-se como uma forma de leishmaniose cutânea no local da inoculação do parasita pelo inseto e, devido à metástase pelo organismo, as áreas das mucosas são atingidas. Essas lesões aparecem devagar e de forma progressiva, e neste caso, a destruição de tecido pode se estender levando à obstrução do septo nasal, afetando órgãos como a orofaringe, a faringe e até a traquéia (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998). Cabe ressaltar que, estágios mais avançados deste tipo de leishmaniose podem levar a mutilação de órgãos da face (PEARSON & SOUSA, 1995). No Novo Mundo, está associada aos indivíduos imunossuprimidos infectados pelo vírus do HIV (GOIHMAN-YAHR, 1994).

Na tabela abaixo estão relacionados os tipos de manifestações clínicas para diferentes espécies de *Leishmania*:

Tabela 01: Diferentes manifestações clínicas da leishmaniose relacionadas a algumas das principais espécies do gênero *Leishmania* (LAINSON & SHAW, 1987).

Manifestação clínica	Subgênero	Especie	Local
Leishmaniose visceral ou Calazar	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania (L.) donovani</i> <i>Leishmania (L.) infantum</i>	Velho Mundo
		<i>Leishmania (L.) chagasi</i>	Novo Mundo
Leishmaniose cutânea	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania (L.) major</i> <i>Leishmania (L.) tropica</i> <i>Leishmania (L.) infantum</i>	Velho Mundo
		<i>Leishmania (L.) amazonensis</i> <i>Leishmania (L.) tropica</i> <i>Leishmania (L.) pifanoi</i>	Novo Mundo
	<i>Viannia</i>	<i>Leishmania (V.) guyanensis</i> <i>Leishmania (V.) peruviana</i> <i>Leishmania (V.) panamensis</i>	
Leishmaniose cutânea difusa	<i>Leishmania</i>	<i>Leishmania (L.) pifanoi</i> <i>Leishmania (L.) mexicana</i>	Novo Mundo
		<i>Leishmania (L.) aethiopica</i>	Velho Mundo
Leishmaniose mucocutânea ou Espundia	<i>Viannia</i>	<i>Leishmania (V.) braziliensis</i> <i>Leishmania (V.) panamensis</i>	Novo Mundo

1.1.2 O Ciclo do parasita

O parasita apresenta um ciclo dimórfico, estando presente em dois tipos de hospedeiro: nas fêmeas dos flebotomíneos, vivendo no sistema digestivo sob a forma flagelada ou promastigota (extracelular), e nos mamíferos, vivendo juntamente com o fagolisossomo de macrófagos, sob a forma amastigota (intracelular). A transmissão da doença para o mamífero ocorre pela inoculação, feita pelo inseto, de uma forma infectante do parasita denominada promastigota metacíclica. No mamífero, esta forma é fagocitada por macrófagos e subsequente se transforma na forma amastigota. Esta forma se multiplica no interior do fagolisossomo e, quando a célula hospedeira está saturada, as amastigotas são liberadas e infectam outra célula hospedeira. A infecção do flebotomíneo ocorre quando macrófagos infectados são ingeridos pela fêmea e as formas amastigotas são imediatamente liberadas e transformadas na forma promastigota e metacíclica (BATES, 1994).

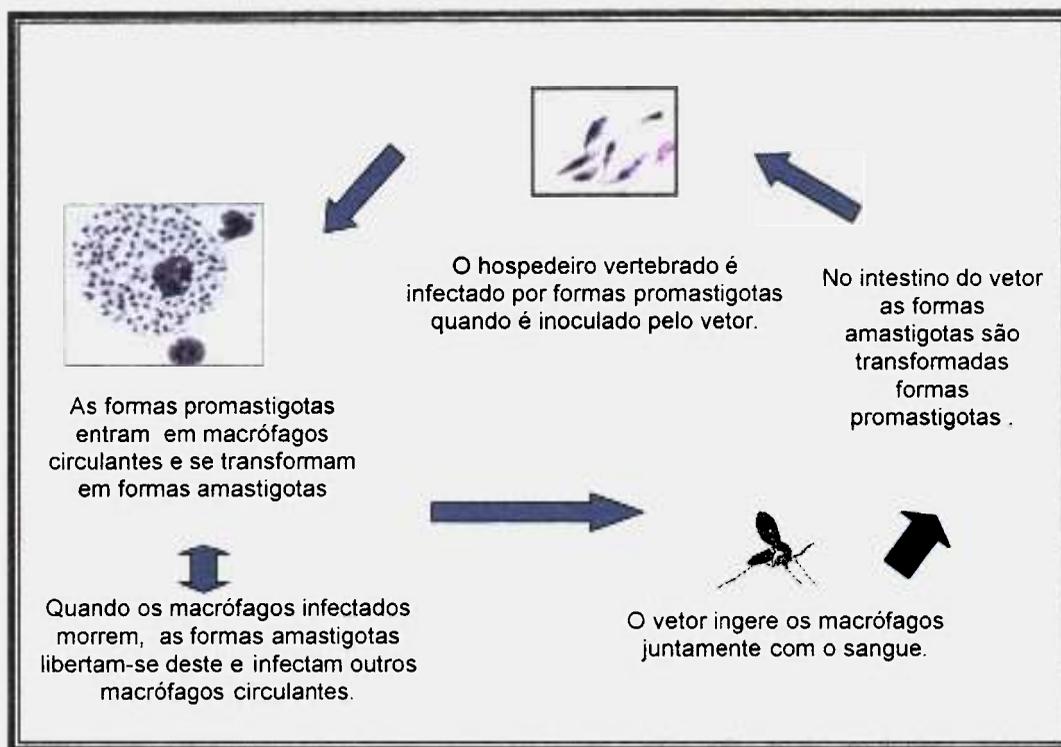


Figura 01: Ciclo do parasita *Leishmania* spp em seus hospedeiros.

1.1.4 Tratamento

Tem-se buscado diversas soluções para o tratamento da leishmaniose, com a administração de diversos tipos de medicamentos.

1.1.4.1 Fármacos de primeira escolha

Antimoniais Pentavalentes: Dentre os fármacos de primeira escolha estão os antimoniais pentavalentes representados pelo antimoniato de meglumina (Glucantime) e pelo estibogluconato de sódio (Pentosam). Ambos agem provocando a depleção dos níveis intracelulares de ATP (Adenosina Trifosfato) devido à interferência no processo de glicólise e na β - oxidação de ácidos graxos em amastigotas de *Leishmania spp.* (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998). As poucas diferenças entre o modo de ação dos dois fármacos estão relacionadas à estabilidade e à toxicidade (MARSDEN & NONATA, 1975).

1.1.4.2 Fármacos de segunda escolha

Pentamidina: Esse fármaco foi sintetizado primeiramente com o objetivo de ser utilizado como agente hipoglicemiante. Posteriormente, foi descoberta sua propriedade quimioterápica e assim passou a ser utilizado como agente antiprotozoário. Desde então, tem sido utilizado como um terapia alternativa (segunda escolha) em alguns casos de leishmaniose (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998).

Em doses terapêuticas, os efeitos colaterais, após a administração destes fármacos, aparecem em 30 a 50% de pacientes tratados. Dentre esses efeitos é possível citar a taquicardia, lesões na pele, dores de cabeça e vômito. Após o tratamento contínuo, efeitos como a hipotensão, hipoglicemia, alterações

cardíacas, nefrotoxicidade e morte súbita foram descritos (CONTE, 1991). Além disso, estudos moleculares mais avançados determinam fatores que contribuem para a resistência de algumas cepas à pentamidina (BASSELIN *et al*, 1996).

Além de ser tóxica e de serem relatados casos de resistência adquirida pelo parasita, o mecanismo de ação da pentamidina não é muito conhecido. Portanto, o seu uso apresenta controvérsias (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998).

Anfotericina B: O uso de formulações lipídicas contendo anfotericina B tem sido um dos maiores avanços no tratamento da leishmaniose. A anfotericina B é um antibiótico anfótero que se liga às membranas celulares e altera a sua permeabilidade, criando poros e extravasamento de íons, levando assim o parasita à morte e sendo portanto muito eficaz em cepas de *Leishmania* resistentes aos antimoniais (MISHA *et al*, 1994).

No entanto, estes apresentam um custo muito elevado quando comparado aos antimoniais e além disso, em altas doses de administração foram observados febre, diminuição dos níveis de potássio e magnésio e nefrotoxicidade (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998).

1.1.4.3 Formas alternativas de tratamento

Recentemente, Interferon γ recombinante tem sido utilizado como adjuvante em associação com antimoniais pentavalentes no tratamento de leishmaniose cutânea (BADARÓ & JONHSON, 1993).

Outros fármacos como o cetoconazol (BERMAN, 1998), itraconazol (ALBANESE *et al*, 1989), paramomicina (OLLIARO & BRYCESON, 1993) e alopurinol em combinação com outros agentes antileishmania têm sido utilizados

no tratamento da leishmaniose cutânea em alguns países da América Latina, porém, este tipo de tratamento não tem sido recomendado (HERWADT & BERMAN, 1992).

Considerando-se as falhas apresentadas no tratamento disponível para a leishmaniose, a busca de novos compostos que sejam mais eficazes no combate à doença é de fundamental importância.

Cabe ressaltar que existem poucos fármacos novos no mercado mundial e, tratando-se de doenças tropicais sabe-se que das 1223 substâncias químicas terapêuticas introduzidas e comercializadas no mundo inteiro entre 1975 e 1996, 379 são realmente inovações terapêuticas e menos de 1% destas inovações foram destinadas às doenças tropicais que incluem dentre outras doenças a própria leishmaniose (TROUILLER & OLLIARO, 1999).

Seguindo este raciocínio, a utilização de componentes provenientes de fontes naturais poderia ser outra alternativa de tratamento.

Estudos têm mostrado que toxinas podem ser empregadas na elaboração de novos fármacos. Como exemplo, podemos citar:

- A tubocurarina, toxina que há muito tempo é conhecida como um alcalóide letal, foi posteriormente introduzida como o primeiro relaxante muscular na prática anestésica (HARVEY *et al*, 1998) e além disso outros estudos demonstram a sua ação citolítica em células tumorais (BLISHCHENCO & KARELIN, 1994).
- A toxina botulínica é uma das substâncias mais tóxicas já encontrada, entretanto, atualmente, tem sido utilizada para provocar paralisia muscular local no tratamento de síndromes associadas com a hiperatividade do

músculo esquelético (HARVEY *et al*, 1998). É também utilizada como adjuvante no tratamento do rejuvenescimento facial (CARRUTHERS & CARRUTHERS, 1998).

- Um dos maiores sucessos na descoberta de fármacos oriundos de toxinas é o captopril, um medicamento utilizado no controle da pressão arterial desenvolvido a partir de peptídeos isolados do veneno da serpente *Bothrops jararaca* (FERREIRA, 1985).

SKARNES, em 1970, relatou um efeito bactericida de venenos de Viperídeas e da L- aminoácido oxidase provenientes da purificação do veneno de *Crotalus adamanteus*. Além disso, outros estudos mostraram que um grupo de proteínas de baixo peso molecular isolados do veneno da Cobra (*Hemachatus hemachatus*) apresentaram atividade lítica contra *Staphylococcus aureus* e *Escherichia coli* (ALLOOF-HIRSCH *et al*, 1968).

Outros estudos mostram que proteínas purificadas do veneno da serpente *Pseudechis australis* (LA01 e LA02), também apresentam efeito bactericida associado com a atividade da enzima L- aminoácido oxidase (STILES *et al*, 1991).

No caso da leishmaniose, venenos de serpentes têm sido testados, buscando-se uma terapia alternativa.

Estudos pilotos foram realizados em testes com veneno das serpentes *Cerastes cerastes* e *Naja haje* em cultura de *Leishmania (L.) infantum* e *Trypanossoma cruzi* e verificou-se uma certa inibição, dependendo da concentração utilizada (FERNANDEZ-GOMES *et al*, 1994).

TEMPONE, em 1999, verificou que veneno de *Bothrops moojeni* apresenta atividade antileishmania, *in vitro*, que esta atividade está relacionada à enzima L-

aminoácido oxidase. Após a purificação do veneno, por meio de técnicas cromatográficas, o autor observou que as frações com as atividades antileishmania e L- aminoácido oxidase, eluíam nas mesmas posições.

1.2 OS VENENOS DE SERPENTES

Serpentes (classe *Reptilia*, ordem *Squamata*) provavelmente surgiram na era Cretácea, há aproximadamente 135 milhões de anos atrás. Compreendem cerca de 3300 espécies que são classificadas em 11 famílias, sendo as mais venenosas as famílias *Elapidae*, *Atractaspididae*, *Viperidae* e *Colubridae* (MEIER, 1990).

Os venenos ofídicos são misturas complexas, constituídas principalmente por proteínas, peptídeos e, em pequenas proporções, carboidratos, lipídeos, nucleotídeos, aminoácidos e componentes inorgânicos. Os principais componentes tóxicos são enzimas e outras proteínas, as quais estão diretamente relacionadas com a alimentação e defesa da serpente, promovendo imobilização e morte da presa animal (MEIER, 1990).

Essas proteínas podem levar aos diversos efeitos bioquímicos, imunológicos, farmacológicos e patológicos, podendo induzir lesões no tecido local, efeito sistêmico e morbidade ou morte relacionada com a toxicidade do veneno (ROSENFELD, 1991).

Os componentes protéicos ativos presentes nos venenos de serpentes, em geral, podem ser classificados como enzimáticos e não enzimáticos. Dentre os componentes enzimáticos pode-se citar a fosfolipase A₂ (PLA₂), a fosfodiesterase, arginina éster hidrolase, acetilcolinesterase, 5' nucleotidase, hialuronidase, a L-aminoácido oxidase e outras (TAN & PONNUDURAI, 1990).

Nos venenos de serpentes, é possível encontrar uma das mais importantes enzimas: a fosfolipase A₂ (PLA₂), que induz a uma grande variedade de sintomas

patológicos em animais, pois apresenta atividades farmacológica e catalítica. Além disso, induz diversos efeitos tais como: neurotoxicidade pós e pré sináptica, miotoxicidade, carditoxicidade, atividades hemolíticas, anticoagulante, convulsivante, hipotensiva e formação de edema (KINI & EVANS, 1989).

As fosfodiesterases são enzimas que hidrolisam ligações fosfomonoéster e fosfodiéster. A exonuclease é um dos exemplos das fosfodiesterases mais comuns em venenos de serpentes e sua principal função é ser utilizada para degradar ácidos nucleicos (XU & KOOL, 1998).

A arginina éster hidrolase é uma protease que está presente nos venenos das famílias *Crotalidae* e *Viperidae*, cuja função é a liberação de cininas que agem no processo de coagulação. O isolamento e a caracterização inicial desta enzima, proveniente do veneno de *Bothrops jararacussu*, já foram descritos por alguns autores (ANDRILAO-ESCARSO *et al*, 1999).

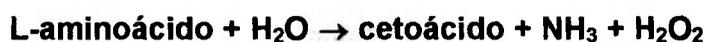
A acetilcolinesterase é uma enzima que apresenta um papel fundamental na transmissão colinérgica devido à rápida inativação do neurotransmissor acetilcolina. Atualmente, existem estudos mais aprofundados que demonstram que esta enzima é abundante em venenos de serpentes da família *Elapidae* (FROBERT *et al*, 1997).

A 5' nucleotidase é uma enzima presente em vários venenos de serpentes. Esta enzima pode atuar como um inibidor de agregação plaquetária (OUYANG & HUANG, 1983) sendo uma metaloproteína zinco – dependente (FINI *et al*, 1990).

A hialuronidase também está presente em muitos venenos e realiza a despolimerização do ácido hialurônico, um mucopolissacarídeo presente na pele, no tecido conectivo e nas junções ósseas cuja função é promover a adesão

intracelular. Sendo assim, esta enzima facilita a difusão da toxina para o tecido das vítimas (JIMENEZ-PORRAS, 1970).

A L-aminoácido oxidase é o componente responsável pela cor amarela de alguns venenos ofídicos pois apresenta dois moles de FAD por mol de enzima como grupo prostético. A enzima nativa é uma glicoproteína dimérica de peso molecular de aproximadamente 130 KDa constituída por duas subunidades de peso molecular de aproximadamente 70 KDa cada e interligadas de forma não covalente (JIMENEZ-PORRAS, 1970). Esta enzima catalisa a oxidação desaminativa de L-aminoácidos, produzindo o cetoácido correspondente, peróxido de hidrogênio e amônia, (TAN & SAIFUDDIN, 1991; PESSATI *et al*, 1995) como descreve a seguinte reação:



Os componentes não enzimáticos também apresentam grande importância e incluem as neurotoxinas, citotoxinas, miotoxinas, cardiotoxinas, hemolisinas e outros (WHITE & POUNDER, 1984).

A composição de venenos de diferentes espécies ou mesmo dentro de uma mesma espécie, pode mostrar uma considerável variação devido aos fatores geográficos (DALTRY *et al*, 1996) e também devido ao clima e a alimentação das serpentes (WILLEMSE, 1978).

Neste estudo foram analisados venenos de várias espécies do mundo, sendo a maior parte deles provenientes da Austrália.

A maior parte dos venenos de serpentes encontradas na Austrália da família *Elapidae* (WHITE & POUNDER, 1984). Embora estes venenos de

serpentes apresentem um sistema de liberação menos eficiente, quando comparado aos das serpentes da família *Viperidae*, seus venenos se mostram extremamente potentes (TAN & PONNUDURAI, 1990), sendo então considerados uns dos venenos ofídicos mais tóxicos do mundo (FRY, 1999). Os componentes ativos dos venenos elapídicos incluem neurotoxinas, miotoxinas, hemolisinas e fatores de produção de hipocoagulabilidade. Assim, estudos comparativos das propriedades biológicas destes venenos podem contribuir para a diferenciação das espécies bem como serem aplicados na taxonomia (TAN & PONNUDURAI, 1990).

Devido à alta toxicidade, diversas técnicas têm sido empregadas na destoxicação de venenos de um modo geral, incluindo a utilização dos raios ultravioleta (TEJASEN & OTTOLENGHI, 1970), o formaldeído (GRASSET, 1945), a carboximetilcelulose (MOROZ *et al*, 1963), os Raios -X (FLOWERS & GOUCHER, 1965), a fotoxidação (KOCHOLATY *et al*, 1968), o glutaraldeído (GUIDOLIN *et al*, 1989), a iodação (DANIEL *et al*, 1987) e a radiação gamma (SALAFRANCA, 1973; KANKONKAR *et al*, 1975; HERRERA *et al*, 1986; BARIDE *et al*, 1980).

Sabe-se que a radiação ionizante pode promover modificações nas biomoléculas, levando à redução da toxicidade com manutenção das propriedades imunológicas (NASCIMENTO *et al*, 1996; ROGERO & NASCIMENTO, 1995; CARDI *et al*, 1997).

1.3 A 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 são muitas vezes 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 e emitindo energia sob a forma de luz visível ou ultravioleta (GROSCH & HOPYWOOD, 1979).

A partir de estudos com os efeitos da radiação ionizante sobre sistemas biológicos, considerou-se seus efeitos sobre a molécula da água, que é a molécula mais abundante neste tipo de sistema podendo gerar espécies moleculares e radicais livres quando pura ou em soluções diluídas:



Quando em solução, esses produtos da radiólise da água, podem difundir e reagir com macromoléculas bioquimicamente ativas e causar perda de atividade biológica (NASCIMENTO *et al*, 1996; ROGERO & NASCIMENTO, 1995).

No caso da radiação ionizante, a espécie mais reativa gerada pela radiólise da água é o radical hidroxila (OH^*) (CHAPMAN, 1993) que junto com o ânion superóxido ($\text{O}_2^{\cdot-}$) e peróxido de hidrogênio (H_2O_2) são capazes de produzir dano às moléculas (GREENSTOCK, 1981).

A inativação de moléculas protéicas pode se dar de duas maneiras:

- Efeito direto- ocorre quando o evento primário, ou seja, a ionização, é produzida na própria molécula. Esse efeito se apresenta quando um componente puro é irradiado no estado seco.

- Efeito indireto- é resultado de reações entre as moléculas estudadas e os produtos da interação da radiação com a água e outros solventes, dado que só ocorre quando se irradia em solução. Neste caso, componentes altamente reativos, chamados de produtos de radiólise da água, na sua maioria radicais livres, são formados e sofrem várias reações entre eles, com o gás dissolvido e com outras moléculas na solução. Assim, quando o componente é irradiado em solução o efeito direto se soma ao indireto.

O efeito indireto da radiação mostrou uma maior sensibilidade nas soluções diluídas em presença de oxigênio, assim como um efeito protetor de outras substâncias orgânicas presentes na solução. Isso mostra que o efeito final da irradiação das proteínas se modificará de acordo com as condições de irradiação, além de outros fatores como tipo e qualidade, que influenciam no efeito da radiação (GROSCH & HOPYWOOD, 1979).

Alterações químicas de alguns aminoácidos, quebra de pontes de dissulfeto, mudanças conformacionais devido aos distúrbios nas pontes de hidrogênio e ligações cruzadas na cadeia polipeptídica podem ocorrer e levar a uma perda de atividade biológica. Porém as propriedades antigênicas são aquelas que se apresentam mais radorresistentes (GUARNIERI, 1992). Sendo assim, pode-se concluir que a radiação gama pode induzir a destoxicação de diversas

toxinas isoladas ou venenos brutos com manutenção das propriedades antigênicas e imunogênicas.

A irradiação de venenos ofídicos, em um certo intervalo de dose, resulta em um produto com baixa ou nenhuma toxicidade preservando as propriedades imunológicas (ROGERO & NASCIMENTO, 1995).

SALAFRANCA (1973) utilizou o processo de destoxicação por radiação ionizante para o veneno de *Naja naja philipinensis*. Toxinas isoladas dos venenos de *Bothrops jararacussu* e *Bothrops jararaca* foram também destoxicadas por radiação gama e as suas propriedades imunogênicas foram mantidas (SPENCER, 1995; GUARNIERI, 1992)

MURATA *et al* (1990) também utilizaram o veneno de *Crotalus durissus terrificus* mostrando que a melhor dose para irradiar venenos em solução, que promove uma significativa destoxicação, mantendo as propriedades imunológicas originais, quando testadas em camundongos, coelhos e cavalos, é a dose de 2000 Gy.

O Gray (Gy) é a unidade definida pelo Sistema Internacional de Unidades. Esta unidade é equivalente a 1 joule de energia depositada em 1 quilograma de matéria de dose de radiação absorvida (LATARJET, 1995).

Considerando-se o problema da leishmaniose no Brasil e os indícios de que os venenos de serpentes podem inibir o crescimento do parasita, associado com a técnica de destoxicação por meio da radiação ionizante, foi realizada uma ampliação destes estudos de inibição de crescimento da *Leishmania sp*, envolvendo alguns venenos das serpentes mais peçonhentas do mundo (FRY, 1999), destoxicadas pela radiação gama de ^{60}Co .

2.1 Gerais

Caracterizar e testar os venenos das seguintes serpentes quanto a capacidade de inibição do crescimento de *Leishmania (L.) amazonensis*.

Acanthophis antarcticus, *Agkistrodon bilineatus*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops jararaca*, *Hoplocephalus stephensi*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Notechis ater niger*, *Notechis scutatus*, *Oxyuranus microlepidotus*, *Oxyuranus scutellatus*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colletti*, *Pseudechis guttatus*, *Pseudechis porphyriacus* e *Pseudonaja textilis*.

Em seguida, testar os venenos com poder inibitório, na forma irradiada.

2.2 Específicos

- Determinação da Concentração Efetiva (CE₅₀) dos venenos sobre as formas promastigotas de *Leishmania (L.) amazonensis* e em células de mamíferos LLC-MK₂.
- Comparação da composição protéica de cada um dos venenos por meio de eletroforese SDS-PAGE.
- Determinação da atividade L- AO (L- aminoácido oxidase) dos venenos .
- Determinação da toxicidade dos venenos em *Leishmania (L.) amazonensis* e células de mamíferos LLC-MK₂ na ausência de aminoácidos e na presença de catalase.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Materiais

3.1.1 Venenos Ofídicos

A maioria dos venenos de serpentes foram fornecidos gentilmente pelo Dr. Peter J. Mirtschin (*Venom Supplies Pty Ltd*) na forma liofilizada e outros foram fornecidos pelo Instituto Butantan e CEVAP (Centro de Estudos de Venenos e Animais Peçonhentos), na forma cristalizada:

Tabela 02: As serpentes e seus respectivos nomes científico e popular.

Nome Científico	Nome Popular
<i>Acanthophis antarcticus</i>	Common death ader
<i>Agkistrodon bilineatus</i>	Tropical moccasin
<i>Hoplocephalus stephensi</i>	Stephen's banded snake
<i>Naja melanoleuca</i>	Black Cobra
<i>Naja mossambica</i>	Sipitting Cobra
<i>Notechis ater niger</i>	Peninsula tiger
<i>Notechis scutatus</i>	Mainland tiger
<i>Oxyuranus microlepidotus</i>	Inland taipan
<i>Oxyuranus scutellatus</i>	Coastal taipan
<i>Pseudechis australis</i>	King Brown
<i>Pseudechis colletti</i>	Collett's snake
<i>Pseudechis guttatus</i>	Spotted black
<i>Pseudechis porphyriacus</i>	Red bellied black snake
<i>Pseudonaja textilis</i>	Eastern brown snake
<i>Bothrops moojeni</i>	Caissaca
<i>Bothrops jararaca</i>	Jararaca

3.1.2 Parasitas

Formas promastigotas do protozoário da cepa IFLA/BR/67/PH8 de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram fornecidas pelo Dr. Jeffrey Jon Shaw do Instituto Evandro Chagas.

3.1.3 Células

Para o ensaio de toxicidade em células de mamíferos foram utilizadas a linhagem LLC-MK₂.

3.1.4 Fonte de radiação

Para o processo de irradiação dos venenos ofídicos, foi utilizada uma fonte de ⁶⁰Co (Gamma Cell 220, Atomic Energy Agency of Canadá), disponível no Centro de Técnicas das Radiações do Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares IPEN/CNEN-SP.

3.1.5 Reagentes

Todos os reagentes utilizados foram de qualidade pró- análise. A água destilada utilizada no preparo de soluções foi purificada em aparelho Milli- Q plus-Millipore.

3.2 Métodos

3.2.1 Cultivo de parasitas

Os parasitas, na forma promastigota de *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, foram cultivados em garrafas de plástico de poliestireno de 25cm² (CORNING®) contendo meio de cultura RPMI sem vermelho de fenol (SIGMA®) adicionado de 10% de soro fetal bovino inativo (IMUNOQUÍMICA®), gentamicina (50µg/ml) e hemina (0,25%) em pH 7,2. Em seguida, estes parasitas foram incubados em estufa BOD (Biological Oxygen Demand) (LÁCTEA - Aparelhos Científicos e Eletrônicos Ltda.- modelo NT705) à temperatura de 26°C.

3.2.2 Dosagem de proteínas

O total de proteínas dos venenos ofídicos foi determinado pelo método de BRADFORD (1976). Diversas diluições de uma solução de albumina bovina, foram utilizadas na determinação da curva de calibração obedecendo a seguinte equação: [(Absorvância a 595nm x 1,361) – 0,08].

Este método baseia-se no fato de que determinados aminoácidos hidrófobos podem se ligar ao corante Coomassie Brilliant Blue -250, presente no reagente de Bradford, formando um complexo corante- proteína. Esta proteína, quando em meio altamente ácido, acaba interferindo na absorvância do corante, ocasionando uma modificação proporcional da coloração que é detectável no comprimento de onda de 595nm.

As amostras de venenos na concentração de 1mg/ml foram diluídas (fator = 4) em solução salina contendo 0,9% de NaCl e em seguida foram adicionados

20µl destas amostras em 1ml de reagente de Bradford e 50 µl de solução de NaOH (1M).

Posteriormente, realizou-se a leitura espectrofotométrica a 595nm (Ultrospec 3000 – Pharmacia Biotech®) a partir da qual se calculou a concentração protéica.

3.2.3 Irradiação de venenos

Os venenos que apresentaram atividade antileishmania foram ajustados para uma concentração de 2 mg/ml em solução salina a 0,9% de NaCl e em seguida foram submetidos à radiação gama de ⁶⁰Co em uma dose de 2 kGy (taxa de dose=6,93 kGy/h).

3.2.4 Viabilidade dos parasitas incubados com venenos nativos

e irradiados:

Para o ensaio de viabilidade celular, foi realizada previamente uma contagem dos parasitas em Câmara de Neubauer a partir de uma suspensão diluída 1:10 em meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA®).

Em uma placa de 96 poços (CORNING®), foi realizada uma diluição seriada (fator=2) dos venenos em estudo em meio RPMI 1640 (SIGMA®), partindo-se de uma concentração de 40 µg/ml até 0,625 µg/ml.

Em seguida, os parasitas foram transferidos das garrafas de cultura para a placa na concentração de aproximadamente $3,0 \times 10^6$ parasitas/mL. Estes parasitas, juntamente com os venenos, foram incubados na temperatura de 26°C durante um período de 18 a 24 horas.

Para o teste de viabilidade celular foi utilizado um método enzimático quantitativo que envolve a conversão do sal tetrazolium ou MTT (SIGMA®) (3-[4,5-Dimethylthiazol 2yl]-2,5 diphenyltetrazolium bromide; Thiazolyl blue) em um complexo colorido que pode ser medido espectrofotometricamente (ALFIERI *et al*, 1988; KIDERLEN & KAYE 1990). O método baseia-se na atividade de desidrogenases mitocondriais presentes no parasita (MOSSMANN, 1983; GERLIER & THOMASSET, 1986) que reduzem o MTT (SIGMA®) a um subproduto insolúvel denominado formazan e pela leitura da densidade óptica (D.O.) em 570 nm, é possível determinar a quantidade de parasitas viáveis do sistema.

O MTT, um pó fino de cor amarela, foi dissolvido em solução salina na concentração de 5 mg/ml, em seguida foi esterilizado por filtração em membrana de 0,22 µm (MILLIPORE®) e adicionados (20µl) sobre a placa de cultura, onde foi realizado o ensaio da atividade tóxica do veneno sobre as células. Após 4 horas de incubação (26°C) com o MTT, o formazan foi extraído das mitocôndrias pela adição de 100 µl/poço de SDS- HCl 10% - 0,01M, por um período de 18 horas em estufa a 26°C. Foi realizada então a leitura da D.O. em 570 nm em espectrofotômetro LABSYSTEMS MULTISKAN MS.

3.2.4.1 Determinação das CE₅₀ dos venenos com atividade antileishmania

Para a determinação da Concentração Efetiva (CE₅₀) dos venenos sobre formas promastigotas de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foi utilizado o Software GraphPad Prisma, onde a concentração do veneno variou de 40 a 0,625µg/ml (fator de diluição =2). A porcentagem de morte foi determinada de acordo com a seguinte equação:

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

3.2.4.2 Viabilidade de parasitas em meio de cultura sem aminoácidos

Com a finalidade de verificar se a atividade antileishmania é dependente de aminoácidos presentes no meio de cultura, realizou-se o experimento em Solução de Hank's sem vermelho de fenol com pH balanceado para 7,6 (HBSS), na ausência de aminoácidos.

Os parasitas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* (3,0 x10⁶ parasitas/ml) foram incubados a 26°C em Hank's balanced salt solution (HBSS) pH7,2 sem vermelho de fenol e na presença de diferentes venenos (40µg/ml) solubilizados em solução salina. Após um período de 24 horas foi realizado o teste de viabilidade utilizando a técnica do MTT (SIGMA®).

3.2.4.3 Viabilidade após a incubação dos parasitas com venenos nativos em presença da enzima catalase

Os parasitas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* ($3,0 \times 10^5$ parasitas/ml) foram incubados a 26°C em RPMI sem vermelho de fenol (SIGMA®) adicionado de 10% de soro fetal bovino inativado (IMUNOQUÍMICA®) e gentamicina (50µg/ml) na presença de diferentes venenos (40 µg/ml) bem como adicionados de 20µl da enzima catalase (SIGMA®) na concentração de 300 µg/ml. Após um período de 18 a 24 horas, foi realizado o teste de viabilidade utilizando a técnica do MTT (SIGMA®).

3.2.4.4 Curva padrão de morte de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* com H₂O₂

Com o objetivo de verificar se a atividade antileishmania deve-se ao peróxido de hidrogênio produzido pela enzima L- aminoácido oxidase (L-AO) presente nos venenos, parasitas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis* foram incubados na concentração $3,0 \times 10^5$ parasitas/ml a 26°C em RPMI 1640 sem vermelho de fenol (SIGMA®) adicionado de soro fetal bovino inativo (10%) e gentamicina (50 µg/ml), juntamente com diferentes concentrações de peróxido de hidrogênio a 30% (MERCK®) partindo de 17mM até 0,016 mM. Após um período de 24 horas foi realizado o teste de viabilidade utilizando a técnica do MTT (SIGMA®).

3.2.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de venenos nativos e irradiados

Com o objetivo de se comparar a composição protéica dos diferentes venenos ofídicos e de se determinar a massa molecular de seus componentes, foi realizada uma eletroforese (Sistema Mini- Protean- BioRad®) em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de acordo com o método de LAEMMLI (1970) na concentração de 10% para todos os venenos nativos e também de 12,5% para venenos com atividade antileishmania na forma nativa e irradiada. As amostras (10 a 30 µg), foram dissolvidas em tampão de amostra contendo glicerol, dodecilsulfato de sódio a 10% (SDS), azul de bromofenol e posteriormente fervidas a 100°C por cinco minutos. A coloração foi realizada com Coomassie Brilliant Blue G-250.

Para tanto, foram utilizados padrões de massas moleculares (Pharmacia® – Calibration kits for molecular weight determination using electrophoresis): fosforilase B (94kD), albumina bovina (67kD), ovoalbumina (43kD), anidrase carbônica (30kD), inibidor de tripsina (20,1kD) e α-lactoalbumina (14,4) como referência de baixo peso molecular e a tireoglobulina (330kD), ferritina (220kD), catalase (60kD), lactato desidrogenase (36,kD) e albumina bovina (67kD) como referência de alto peso molecular.

3.2.6 Atividade L- aminoácido oxidase (L-AO)

Para a determinação da atividade de L-AO específica (U/µg) foi realizado um ensaio colorimétrico modificado, utilizando uma solução reagente contendo

0,1mg/ml de OPD (o-phenylenediamine) (SIGMA®), 20 UI/ml de peroxidase (SIGMA®) e 1000 µM de L- leucina (SIGMA®) em tampão tris- HCl 0,1M pH 8,5 (TORII *et al*, 1997).

Foram adicionados 100µl desta solução em uma placa de 96 poços contendo venenos ofídicos com atividade antileishmania (40 µg/ml) diluídos em solução salina. A placa foi incubada por 30 minutos a 26°C e em seguida, foi realizada uma leitura espectrofotométrica ($\lambda=450\text{nm}$ - Ultrospec 3000 –Pharmacia Biotech®) que permitiu determinar, pela absorvância, a presença da enzima L-AO.

O aminoácido (L- leucina) é o substrato da reação onde, juntamente com o oxigênio, sofre uma desaminação resultando em um α - cetoácido, amônia e peróxido de hidrogênio que, por ação da peroxidase presente no sistema, forma um oxigênio que reage com o OPD promovendo coloração ao sistema quando a enzima está presente.

Para a determinação de tal atividade foi realizada uma curva padrão de peróxido de hidrogênio desenvolvida a partir de um cálculo de regressão linear, utilizando o Software GraphPad Prism [nmols H₂O₂ = (D.O. 405nm x 983) –18].

3.2.7 Toxicidade dos venenos com atividade antileishmania em células de mamíferos

3.2.7.1 Cultivo de Células LLCMK₂

Com o objetivo de verificar a toxicidade dos venenos em células de mamíferos, células da linhagem LLCMK₂, foram cultivadas em garrafas de plástico de poliestireno de 25 cm² (CORNING®) contendo meio de cultura RPMI sem

vermelho de fenol (SIGMA®) adicionado de 10% soro fetal bovino inativo (IMUNOQUÍMICA®) e gentamicina (50 µg/ml). Em seguida, as células foram cultivadas em estufa incubadora (Forma Scientific) à temperatura de 37°C com 5% de CO₂.

3.2.7.2 Contagem

A contagem das células foi antecedida por uma lavagem na garrafa de cultura com meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA®) sem soro fetal bovino com o intuito de remover células mortas e não aderidas. Em seguida, foram adicionados 5 ml de ATV estéril (solução contendo 0,2% de Tripsina e 0,02% de Versene – produzida pelo Instituto Adolfo Lutz / Divisão de Biologia Médica). Este volume foi retirado da garrafa e a mesma foi agitada até a remoção das células aderidas. As células foram ressuspensas em um volume de 5 ml de meio de cultura RPMI 1640 sem vermelho de fenol (SIGMA®).

Finalmente, a contagem das células foi realizada em Câmara de Neubauer a partir de uma suspensão de parasitas diluída 1:10 e meio de cultura RPMI 1640 (SIGMA®).

3.2.7.3 Incubação e viabilidade das células com venenos

As células LLCMK₂ foram transferidas para uma a placa de 96 poços (CORNING®) na concentração de aproximadamente $4,0 \times 10^5$ células/poço e incubadas em estufa (Forma Scientific®) à temperatura de 37°C com 5% de CO₂ por um período de 24 horas. Em seguida, foi realizada uma diluição seriada (fator=2) dos venenos em estudo em meio RPMI 1640 (SIGMA®) na placa de 96 poços, partindo de uma concentração de 40 µg/ml até 0,625 µg/ml. As células,

juntamente com os venenos, foram incubadas a 37°C com 5% de CO₂. Após um período de 24 horas foi realizado o teste de viabilidade utilizando a técnica do MTT (SIGMA®).

3.2.7.4 Viabilidade das células LLCMK₂ após a incubação com venenos nativos em presença da enzima catalase

As células da linhagem LLCMK₂ (4,0 x10⁵ células/ml) foram incubadas, em placa de 96 poços, a 26°C em RPMI sem vermelho de fenol (SIGMA®) adicionado de 10% soro fetal bovino inativado (IMUNIQUEMICA®) e gentamicina (50 µg/ml) na presença de diferentes venenos (40µg/ml) e também adicionados de 20 µl da enzima catalase (SIGMA®) na concentração de 300 µg/ml. Após um período de 24 horas foi realizado o teste de viabilidade utilizando a técnica do MTT (SIGMA®).

4.1 Triagem da ação de venenos nativos em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*

Os resultados provenientes do teste de viabilidade de parasitas estão mostrados na figura 03 :

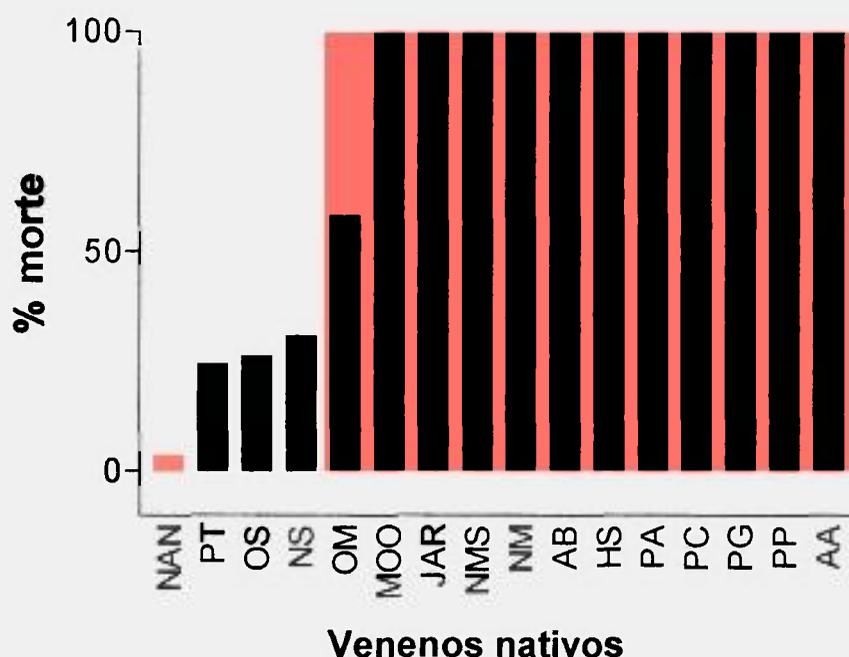


Figura 03: Gráfico comparativo da toxicidade de venenos nativos (40µg/ml) de serpentes sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis*: **AA-** *Acanthophis antarcticus*, **AB-** *Agkistrodon bilineatus*, **JAR-** *Bothrops jararaca*, **MOO-** *Bothrops moojeni*, **HS-** *Hoplocephalus stephensi*, **NM-** *Naja melanoleuca*, **NMS-** *Naja mossambica*, **PA-** *Pseudechis australis*, **PC-** *Pseudechis colletti*, **PG-** *Pseudechis guttatus*, **PP-** *Pseudechis porphyriacus*, **NAN-** *Notechis ater niger*, **NS-** *Notechis scutatus*, **OM-** *Oxyuranus microlepidotus*, **OS-** *Oxyuranus scutellatus* e **PT-** *Pseudojana textilis*.

Conforme pode ser observado, 68,75% dos venenos estudados apresentaram alta atividade.

Alta Atividade

- *Acanthophis antarcticus*,
- *Agkistrodon bilineatus*
- *Bothrops moojeni*
- *Bothrops jararaca*
- *Hoplocephalus stephensi*
- *Naja melanoleuca*,
- *Naja mossambica*
- *Pseudechis australis*
- *Pseudechis colletti*
- *Pseudechis guttatus*
- *Pseudechis porphyriacus*

Baixa Atividade

- *Notechis ater niger*
- *Notechis scutatus*
- *Pseudonaja textilis*
- *Oxyuranus microlepidotus*
- *Oxyuranus scutellatus*

4.2 Determinação da CE₅₀ dos venenos com atividade antileishmania

Uma vez determinados os venenos com atividade antileishmania, uma amostra de cada um foi irradiada seguindo a técnica descrita no método 3.2.3. Em seguida, realizou-se um estudo quantitativo verificando as CE₅₀ (concentração efetiva que inibe 50% do crescimento de parasitas) dos venenos nativos e irradiados.

Tabela 03: Determinação da CE₅₀ dos venenos com atividade antileishmania:

Espécie	CE ₅₀ (µg/ml) nativo	CE ₅₀ (µg/ml) irradiado	
- <i>Acanthophis antarcticus</i>	7.2	7.5	(≅)
- <i>Agkistrodon bilineatus</i>	1.7	3.7	(2X)
- <i>Hoplocephalus stephensi</i>	1.8	2.6	(1,5X)
- <i>Naja mossambica</i>	3.0	>15,5	(5X)
- <i>Naja melanoleuca</i>	2.9	9.7	(3X)
- <i>Pseudechis australis</i>	1.3	2.5	(2X)
- <i>Pseudechis colletti</i>	2.0	2.4	(≅)
- <i>Pseudechis guttatus</i>	0.4	0.8	(2X)
- <i>Pseudechis porphyriacus</i>	6.1	5.6	(≅)
- <i>Bothrops moojeni</i>	3.4	8.1	(2X)
- <i>Bothrops jararaca</i>	2.8	4.8	(2X)

CE₅₀ = Concentração efetiva que inibe 50% do crescimento de parasitas.

(≅) → não apresentaram alteração significativa.

(n X) → número aproximado de vezes de aumento da CE₅₀.

A partir destes resultados, foi possível realizar um estudo comparativo da toxicidade dos venenos, nativos e irradiados, de diferentes espécies de serpentes em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*:

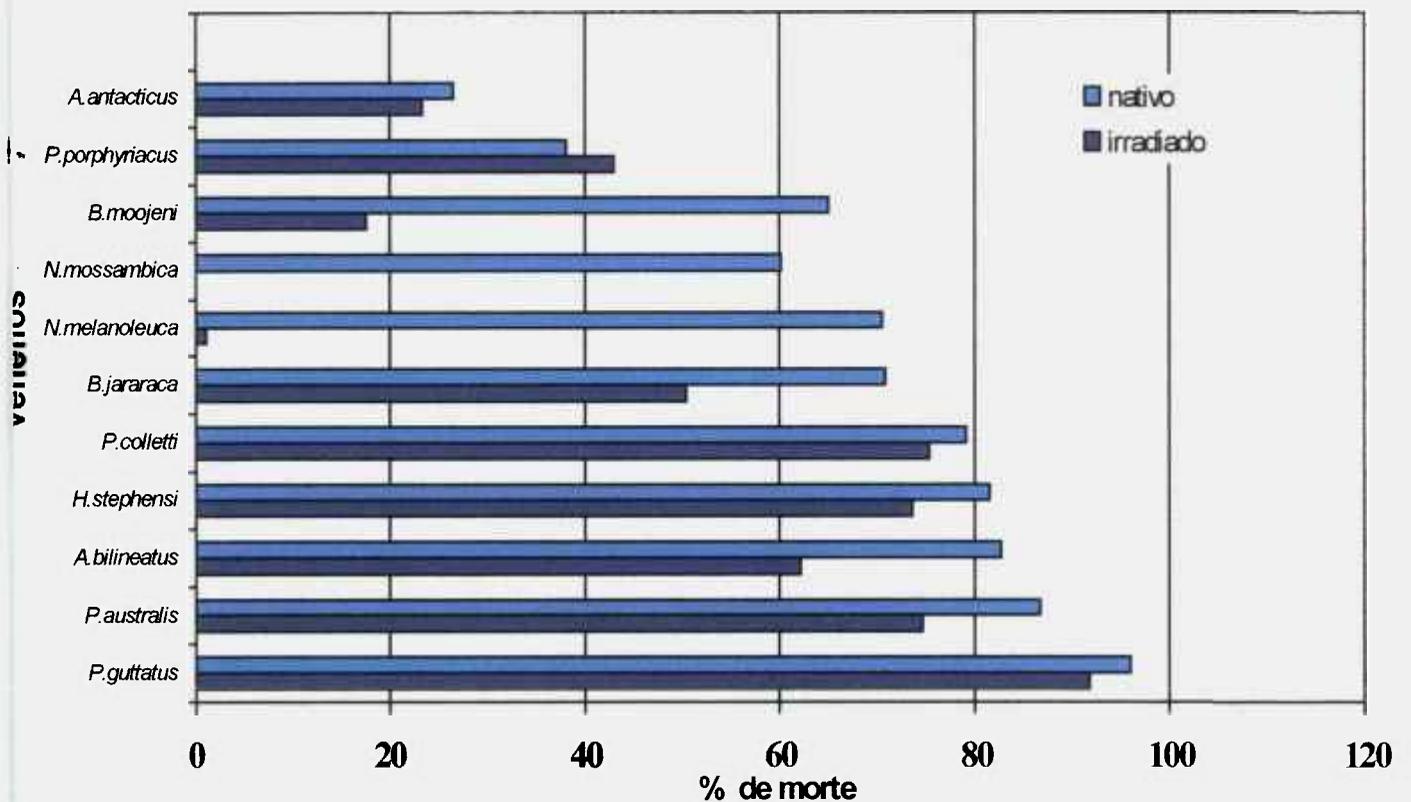


Figura 04: Gráfico comparativo da toxicidade de venenos nativos e irradiados na dose de 2kGy (Taxa de dose = 6,93 kGy/h), avaliada a partir das CE₅₀, em *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. Venenos testados: *Acanthophis antarcticus*, *Agkistrodon bilineatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni*, *Hoplocephalus stephensi*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colletti*, *Pseudechis guttatus* e *Pseudechis porphyriacus*.

Como foi possível observar na tabela 03 e na figura 04, o veneno da espécie *Acanthophis antarcticus*, na forma nativa, apresentou pouca atividade antileishmania, enquanto que o veneno da espécie *Pseudechis guttatus*, tanto na sua forma nativa quanto irradiada, mostrou alta atividade. Cabe ressaltar que os venenos das espécies *Naja mossambica* e *Naja melanoleuca*, na forma irradiada, apresentaram pouca ou nenhuma atividade.

O efeito da radiação não foi o mesmo em todos os venenos: enquanto alguns sofreram pouca alteração, outros tiveram a toxicidade reduzida em até cinco vezes.

4.3 Toxicidade dos venenos nativos e irradiados em células de mamíferos.

O resultado da toxicidade dos venenos sobre células de mamíferos da linhagem LLCMK2 estão apresentados na tabela 04 e na figura 05.

Tabela 04: Determinação da CE_{50} dos venenos em células LLCMK₂.

Espécie	CE_{50}(μg/ml) nativo	CE_{50}(μg/ml) irradiado	
- <i>Acanthophis antarcticus</i>	13.17	18.02	(\cong)
- <i>Agkistrodon bilineatus</i>	4.02	9.12	(2X)
- <i>Hoplocephalus stephensi</i>	4.34	6.04	(\cong)
- <i>Naja melanoleuca</i>	26.52	10.62	(0,4X)
- <i>Naja mossambica</i>	2.75	>26.52	(10 X)
- <i>Pseudechis australis</i>	1.48	2.19	(\cong)
- <i>Pseudechis colletti</i>	1.40	3.40	(2,5X)
- <i>Pseudechis guttatus</i>	0.52	0.78	(\cong)
- <i>Pseudechis porphyriacus</i>	1.32	1.14	(\cong)
- <i>Bothrops moojeni</i>	7.8	>26.52	(3 X)
- <i>Bothrops jararaca</i>	0.82	15.37	(19X)

CE_{50} = Concentração efetiva que inibe 50% do crescimento de células

(\cong) → não apresentaram alteração significativa.

(n X) → número aproximado de vezes de aumento da CE_{50} .

A partir destes resultados, foi possível realizar um estudo comparativo da toxicidade dos venenos de diferentes espécies de serpentes em células de mamíferos da linhagem LLC-MK₂:

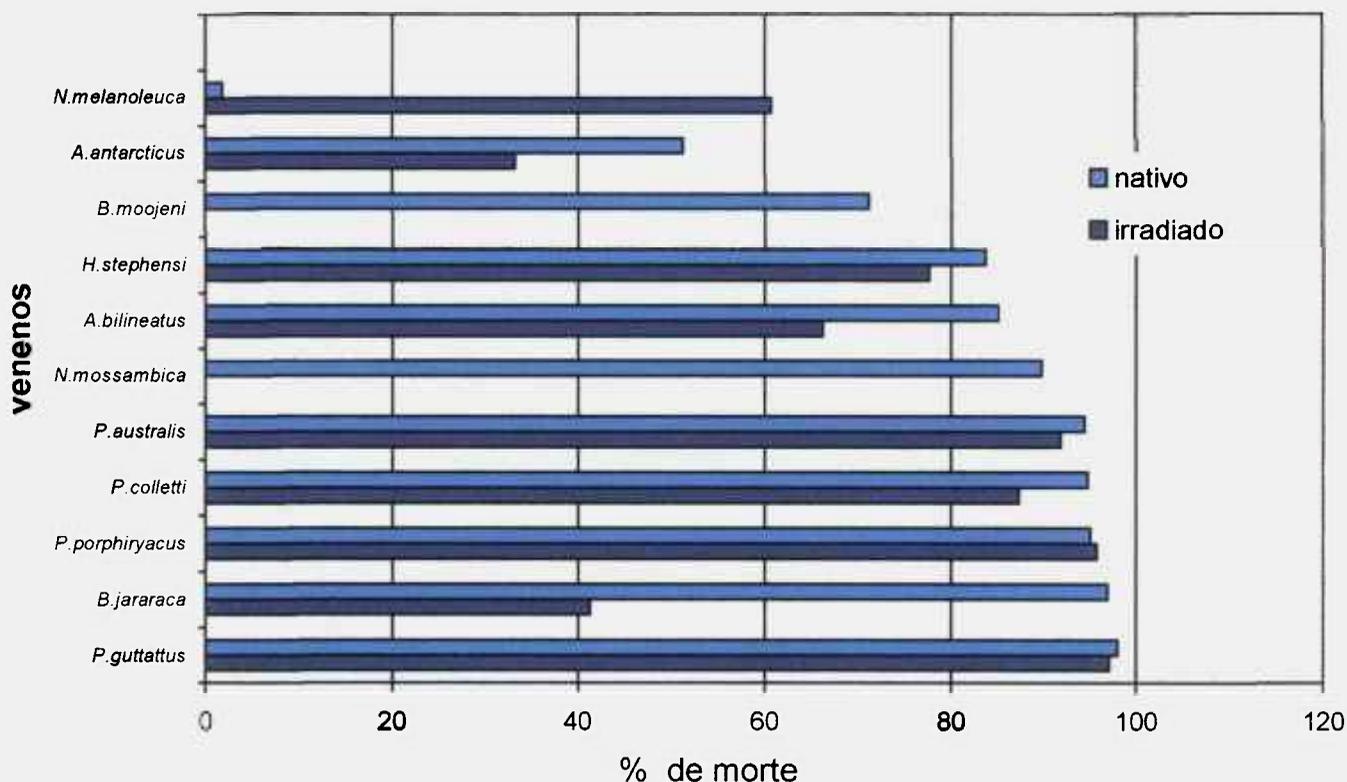


Figura 05: Gráfico comparativo da toxicidade de venenos nativos e irradiados na dose de 2 kGy (Taxa de dose = 6,93 kGy/h), avaliada a partir da EC₅₀, em células de mamíferos da linhagem LLCMK₂. Venenos testados: *Acanthophis antarcticus*, *Agkistrodon bilineatus*, *Bothrops moojeni*, *Bothrops jararaca*, *Hoplocephalus stephensi*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colletti*, *Pseudechis guttatus*, *Pseudechis porphyriacus*.

Como foi possível observar na tabela 04 e na figura 05, o veneno da espécie *Pseudechis guttatus*, tanto na sua forma nativa quanto na sua forma irradiada, apresentou-se mais ativo em relação à toxicidade em células LLC-MK₂, quando comparado aos venenos de outras espécies.

Verificou-se ainda que na maior parte dos venenos houve diminuição da toxicidade dos venenos sobre células LLC-MK₂, com a utilização da radiação gama. Observa-se também que o veneno de *Bothrops jararaca* tem sua toxicidade reduzida em 50%, enquanto que os venenos das espécies *Naja mossambica* e *Bothrops moojeni* não apresentaram qualquer toxicidade em LLC-MK₂ após a irradiação.

Diferentemente dos demais, o veneno de *Naja melanoleuca* teve sua toxicidade aumentada, quando submetido aos efeitos da radiação.

4.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de venenos nativos:

As figuras 06 e 07 mostram eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE na concentração de 10% em condições reduzidas de 10 µg de cada veneno analisado.

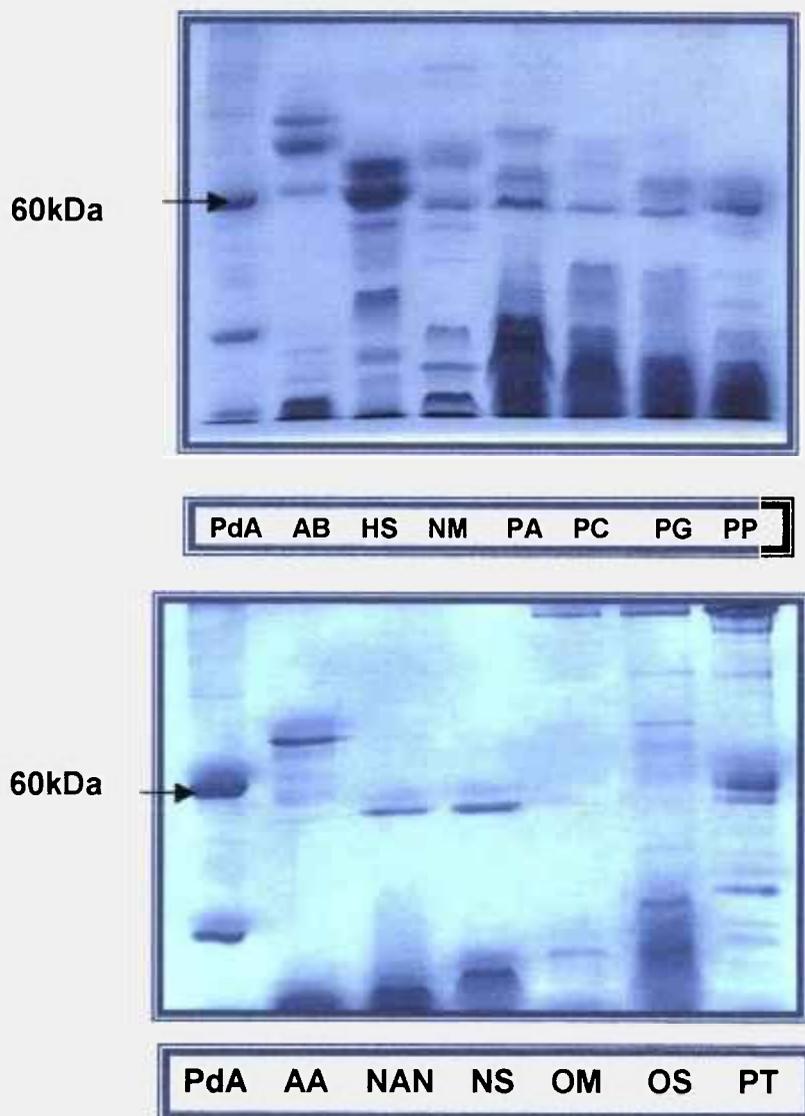


Figura 06 e 07: SDS-PAGE 10% - **PdA**- Padrão de Alto Peso Molecular; **AA**- *Acanthophis antarcticus*, **AB**- *Agkistrodon bilineatus*, **HS**- *Hoplocephalus stephensi*, **NM**- *Naja melanoleuca*, **PA**- *Pseudechis australis*, **PC**- *Pseudechis colletti*, **PG**- *Pseudechis guttatus*, **PP**- *Pseudechis porphyriacus*, **NAN**- *Notechis ater niger*, **NS**- *Notechis scutatus*, **OM**- *Oxyuranus microlepidotus*, **OS**- *Oxyuranus scutellatus* e **PT**- *Pseudojana textilis*.

Podemos observar que as amostras com atividade antileishmania, apresentam uma banda na região de peso molecular em torno de 60kDa (**Figura 06**).

Nos venenos providos de menor atividade, a banda de peso molecular de aproximadamente 60 kDa é menos intensa ou até mesmo inexistente, exceção feita ao veneno de *Pseudonaja textilis* (**Figura 07**).

4.5 Eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de venenos nativos e irradiados:

Amostras dos venenos com atividade antileishmania foram irradiadas e comparadas com os venenos nativos.

As figuras de 08 a 11 mostram eletroforese em gel de poliacrilamida SDS-PAGE de 10 µg de venenos com atividade antileishmania nativos e irradiados.

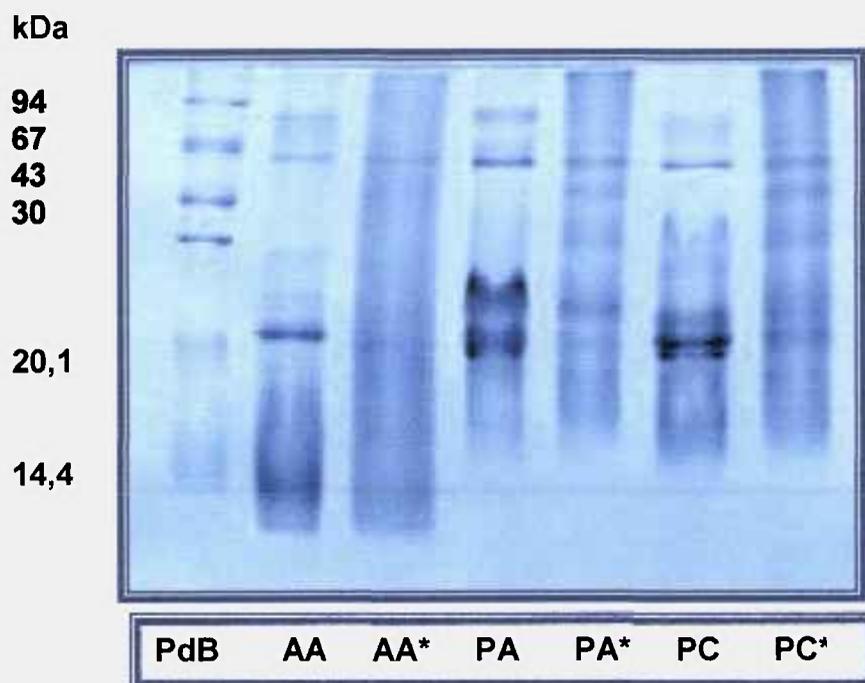


Figura 08: SDS-PAGE 12,5% - **PdB**- Padrão de Baixo Peso Molecular, **AA**- *Acantophis antarcticus*, **PA**- *Pseudechis australis*, **PC**- *Pseudechis colletti*.

* = Venenos Irradiados na dose de 2 kGy (Taxa de dose = 6,93 kGy/h).

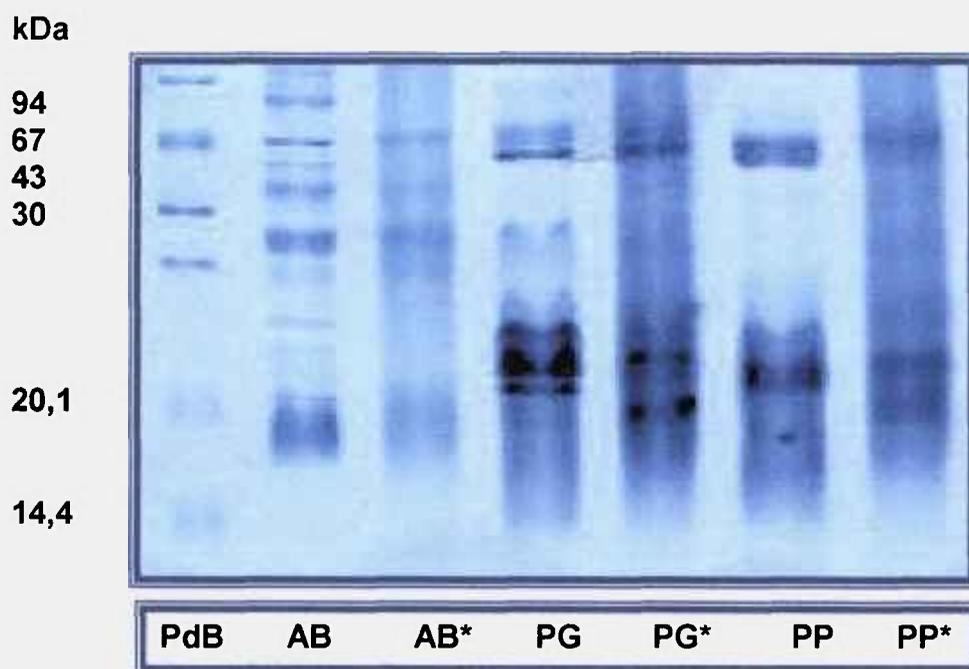


Figura 09: SDS-PAGE 12,5% - **PdB-** Padrão de Baixo Peso Molecular, **AB-** *Agkistrodon bilineatus*, **PG-** *Pseudechis guttatus*, **PP-** *Pseudechis porphyriacus*.

* = Venenos Irrradiados na dose de 2 kGy (Taxa de dose = 6,93 kGy/h).

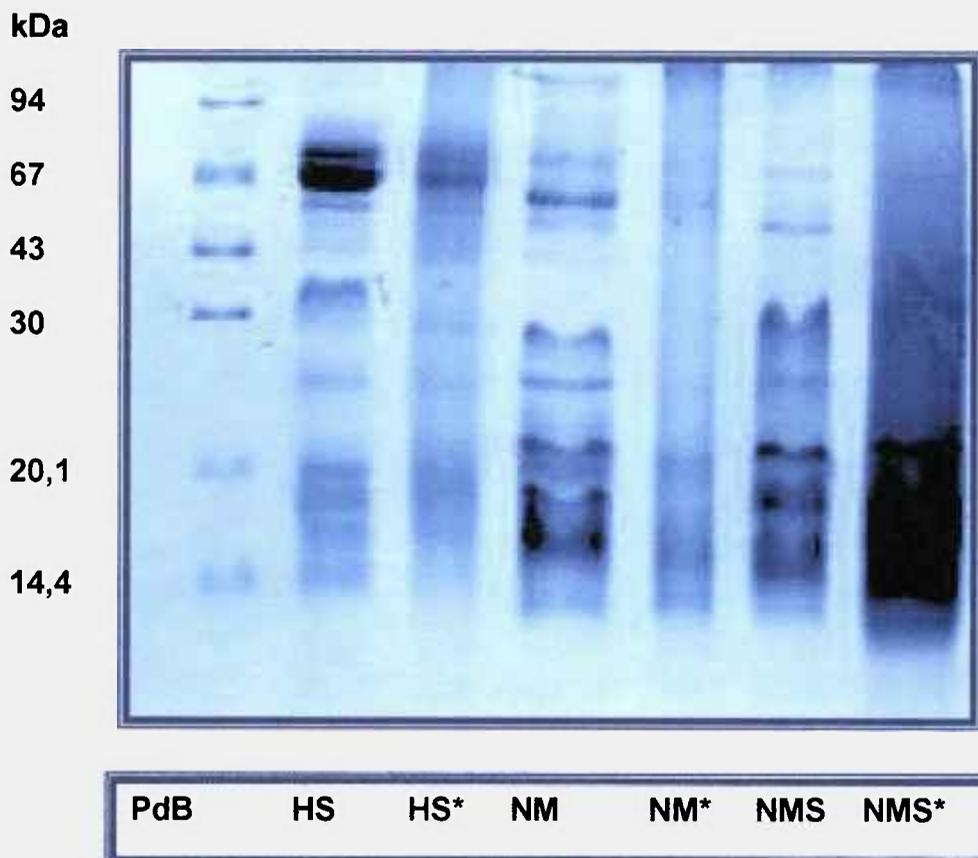


Figura 10: SDS-PAGE 12,5%: **PdB-** Padrão de Baixo Peso Molecular; **HS-** *Hoplocephalus stephensi*, **NM-** *Naja melanoleuca*, **NMS-** *Naja mossambica*.

* = Venenos Irradiados na dose de 2 kGy (Taxa de dose = 6,93 kGy/h).



Figura 11: SDS-PAGE 12,5% - **PdB**- Padrão de Baixo Peso Molecular, **JAR**- *Bothrops jararaca*, **MOO**- *Bothrops moojeni*.

* = Venenos Irradiados na dose de 2 kGy (Taxa de dose = 6,93 kGy/h).

A grande maioria dos venenos apresentaram diminuição da intensidade das bandas de peso molecular em torno de 60 kDa. Entretanto, alguns venenos mostraram perfis diferentes:

- No caso dos venenos de *Pseudechis guttatus* e *Pseudechis porphyriacus*, a banda de 60 kDa apresenta-se de forma mais intensa tanto na forma nativa quanto na forma irradiada, quando comparada às amostras de outros venenos.(Figura 09)
- O veneno de *Hoplocephalus stephensi* , na região de 60 kDa, não mostrou perfil alterado após a irradiação. (Figura 10)
- Para o veneno de *Naja mossambica*, diferentemente dos demais, a banda de 60 kDa se mostra mais intensa após a irradiação.

4.6 Atividade L- amino ácido oxidase (L-AO):

Os resultados do estudo comparativo da atividade L-AO dos diversos venenos que apresentaram atividade antileishmania estão representados na figura 12:

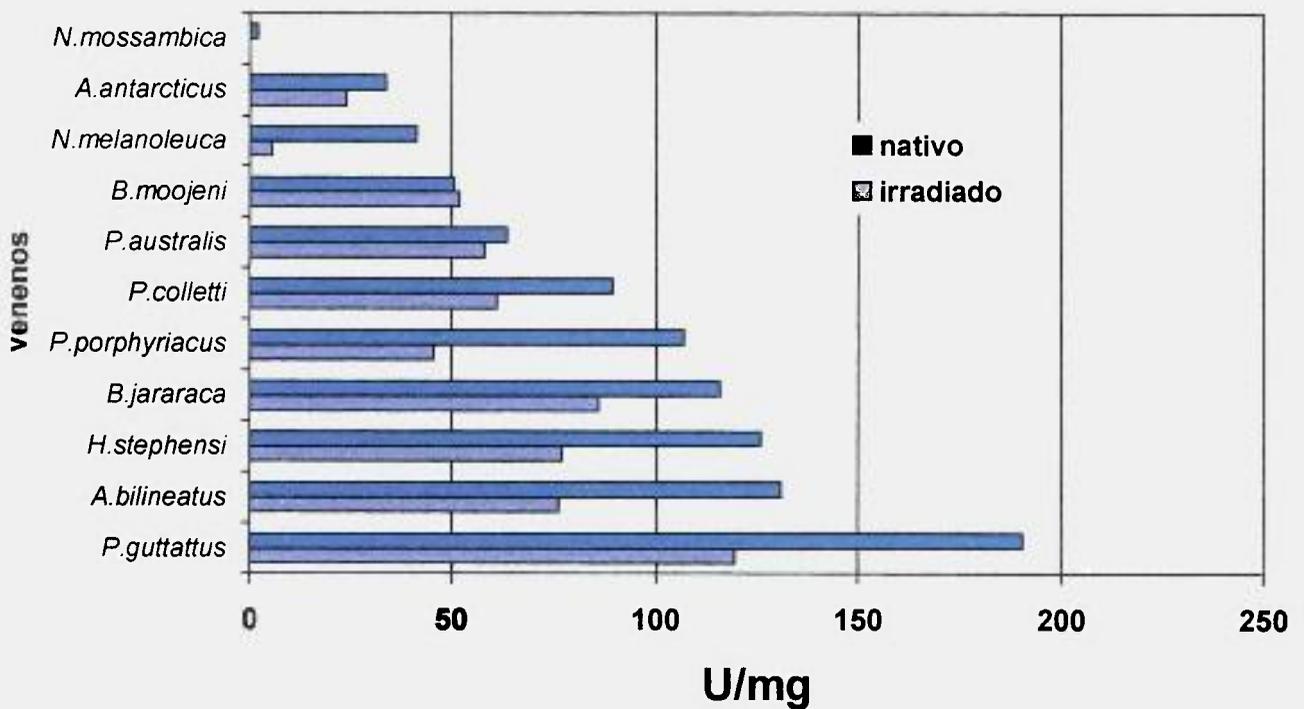


Figura 12: Gráfico comparativo da atividade específica da enzima L-AO de venenos nativos e irradiados das espécies *Acanthophis antarcticus*, *Agkistrodon bilineatus*, *Bothrops jararaca*, *Bothrops moojeni*, *Hoplocephalus stephensi*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colletti*, *Pseudechis guttatus* e *Pseudechis porphyriacus*.

Os dados apresentados na figura 12 demonstram que, comparativamente, o veneno da *Pseudechis guttatus* é o que apresenta a maior atividade L-AO e o da *Naja mossambica*, apresenta menor atividade.

Observa-se também a diminuição da atividade L-AO quando o veneno é submetido ao processo de radiação, sendo que na espécie *Naja mossambica* houve perda total da atividade.

4.7 Viabilidade de parasitas em meio de cultura sem aminoácidos.

Os resultados do experimento realizado em HBSS (Hank's Balanced Salt Solution), na ausência de aminoácidos, está demonstrado na figura 13:

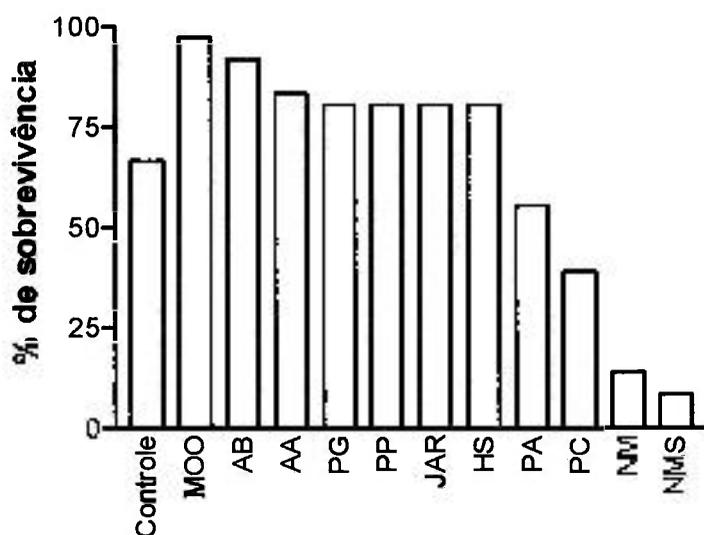


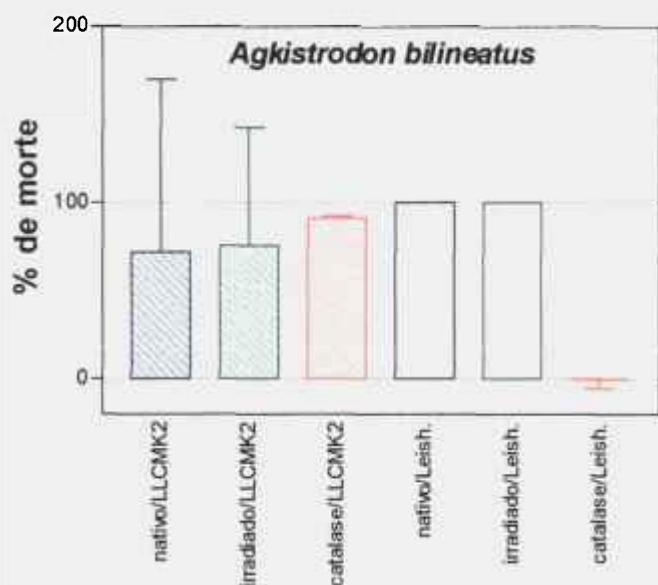
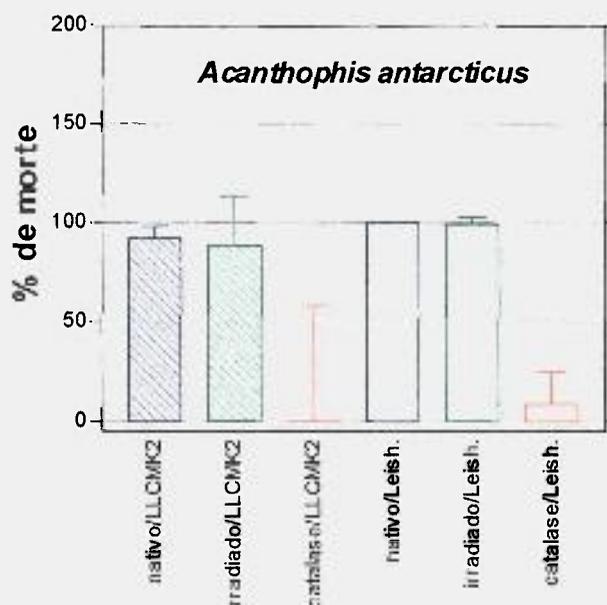
Figura 13: Viabilidade após a incubação de parasitas em HBSS com venenos nativos das espécies **AA-** *Acanthophis antarcticus*, **AB-** *Agkistrodon bilineatus*, **JAR-** *Bothrops jararaca*, **MOO-** *Bothrops moojeni*, **HS-** *Hoplocephalus stephensi*, **NM-** *Naja melanoleuca*, **NMS-** *Naja mossambica*, **PA-** *Pseudechis australis*, **PC-** *Pseudechis colletti*, **PG-** *Pseudechis guttatus* e **PP-** *Pseudechis porphyriacus*.

Neste teste, os parasitas cultivados em HBSS, se mantiveram viáveis na presença da maior parte dos venenos, exceção feita aos venenos das espécies: *Naja mossambica*, *Naja melanoleuca* e *Pseudechis colletti* cuja sobrevivência detectada foi menor que 50% do valor total. Por outro lado, os parasitas quando incubados com os venenos das espécies *Bothrops moojeni* e *Agkistrodon bilineatus* apresentaram uma viabilidade em torno de 100% enquanto que na presença dos venenos de *Bothrops jararaca*, *Hoplocephalus stephensi*, *Pseudechis guttatus* e *Pseudechis porphyriacus* foi de 80% a viabilidade dos parasitas(**Figura 13**).

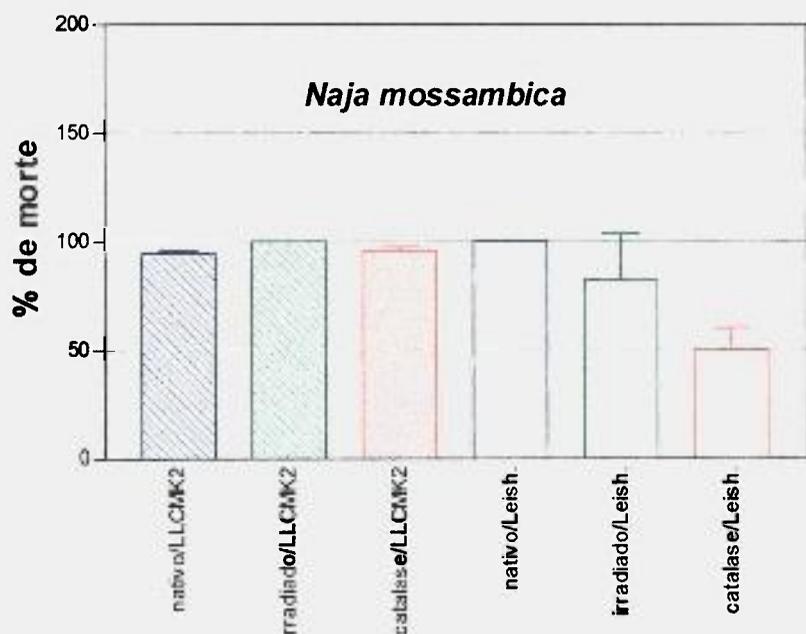
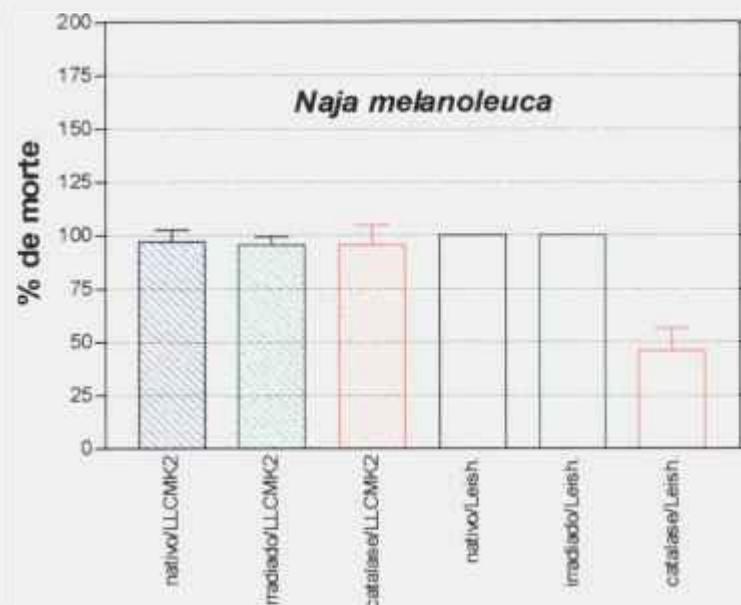
4.8 Viabilidade de parasitas em presença da enzima catalase:

Com o intuito de se verificar a real participação da enzima L- AO no mecanismo de morte de parasitas e células de mamíferos, foi realizado o mesmo procedimento descrito em métodos 3.2.4.6 de viabilidade celular com a presença da enzima catalase no sistema de incubação.

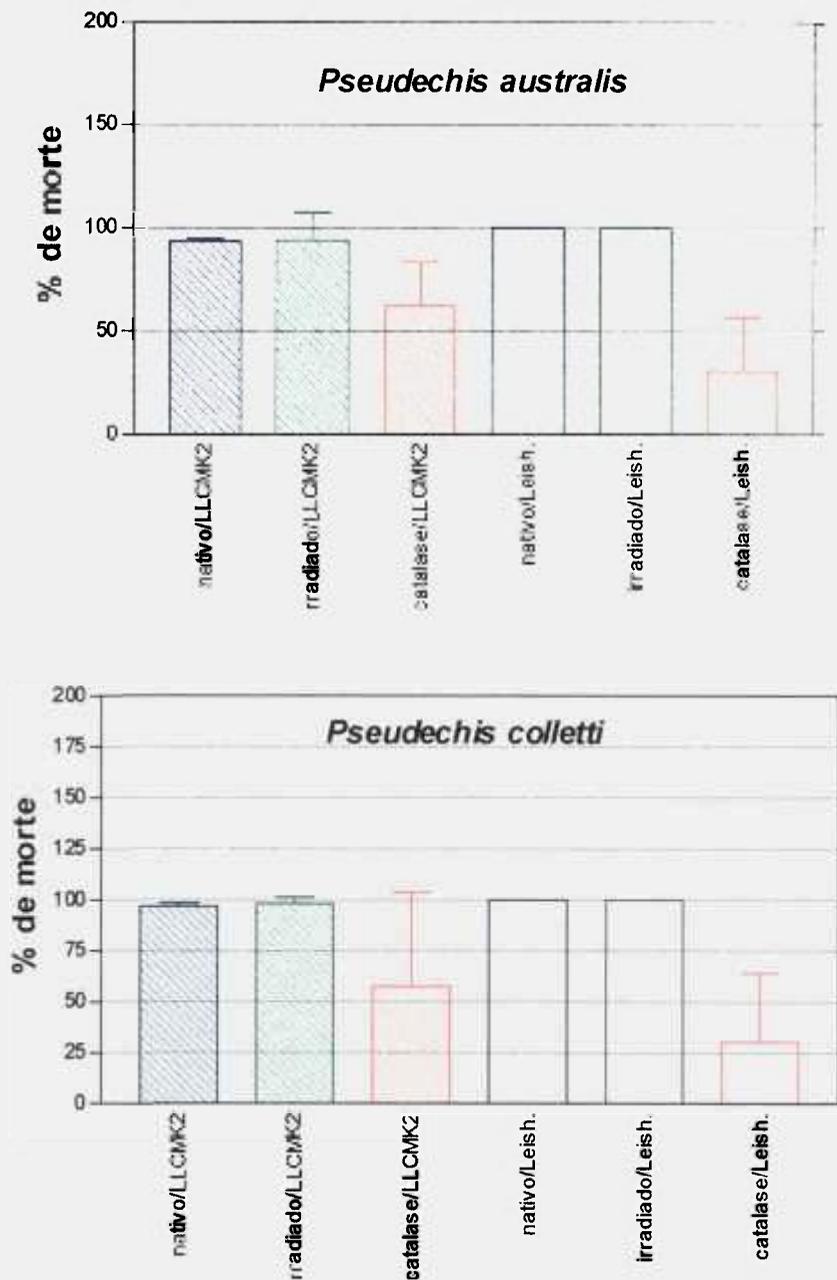
Os gráficos de 14 a 24 representam a toxicidade dos venenos nativos e irradiados sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e em células de mamíferos LLC-MK₂.



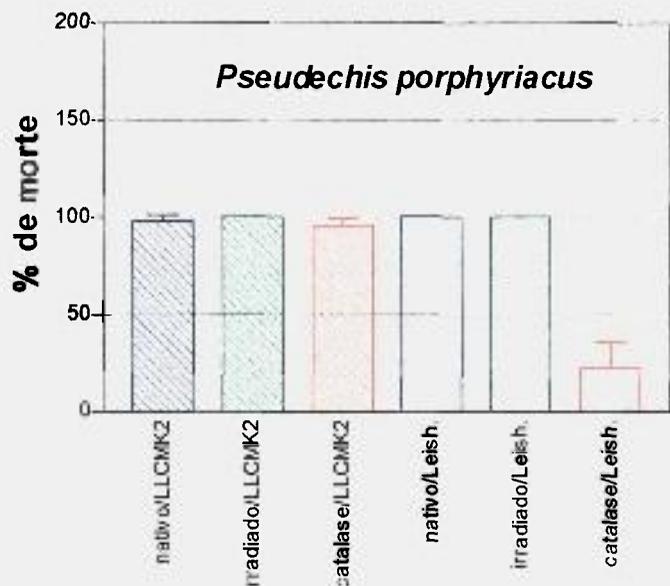
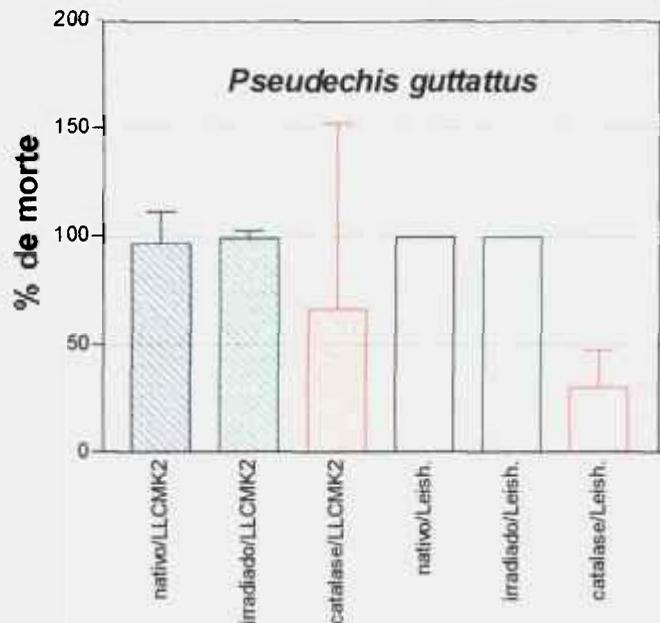
Figuras 14 e 15:Gráfico comparativo entre atividade antileishmania e toxicidade em células da linhagem LLC-MK₂ de venenos (40µg/mL) nativos, nativos na presença de catalase e irradiados das espécies *Acanthophis antarcticus* e *Agkistrodon bilineatus*.



Figuras 16 e 17: Gráfico comparativo entre atividade antileishmania e toxicidade em células da linhagem LLC-MK₂ de venenos (40µg/mL) nativos, nativos na presença de catalase e irradiados das espécies *Naja melanoleuca* e *Naja mossambica*.



Figuras 18 e 19:Gráfico comparativo entre atividade antileishmania e toxicidade em células da linhagem LLC-MK₂ de venenos (40µg/mL) nativos, nativos na presença de catalase e irradiados das espécies *Pseudechis australis* e *Pseudechis colletti*.



Figuras 20 e 21:Gráfico comparativo entre atividade antileishmania e toxicidade em células da linhagem LLC-MK₂ de venenos (40µg/mL) nativos, nativos na presença de catalase e irradiados das espécies *Pseudechis guttatus* e *Pseudechis porphyriacus*.

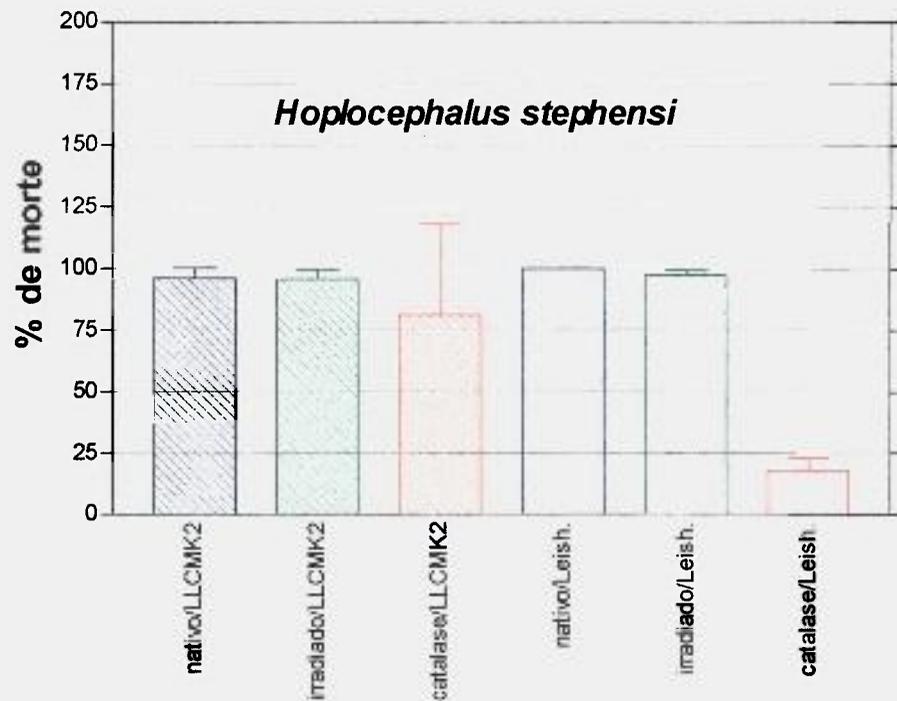


Figura 24 :Gráfico comparativo entre atividade antileishmania e toxicidade em células da linhagem LLC-MK₂ de venenos (40µg/mL) nativos, nativos na presença de catalase e irradiados da espécie *Hoplocephalus stephensi*.

Os resultados das figuras 14 a 24 mostram que todos os venenos nativos ou irradiados, são capazes de inibir o crescimento tanto dos parasitas quanto das células de mamíferos da linhagem LLC-MK₂.

A presença de catalase não afeta, significativamente, o crescimento de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e por outro lado, exceção feita ao veneno de *Acanthophis antarcticus*, ocorre morte de células LLCMK₂ na presença desta enzima.

4.9. Curva da porcentagem de morte de *Leishmania (Leishmania)*

amazonensis provocada por peróxido de hidrogênio:

Os resultados da curva da porcentagem de morte provocada por peróxido de hidrogênio estão demonstrados na figura 25:

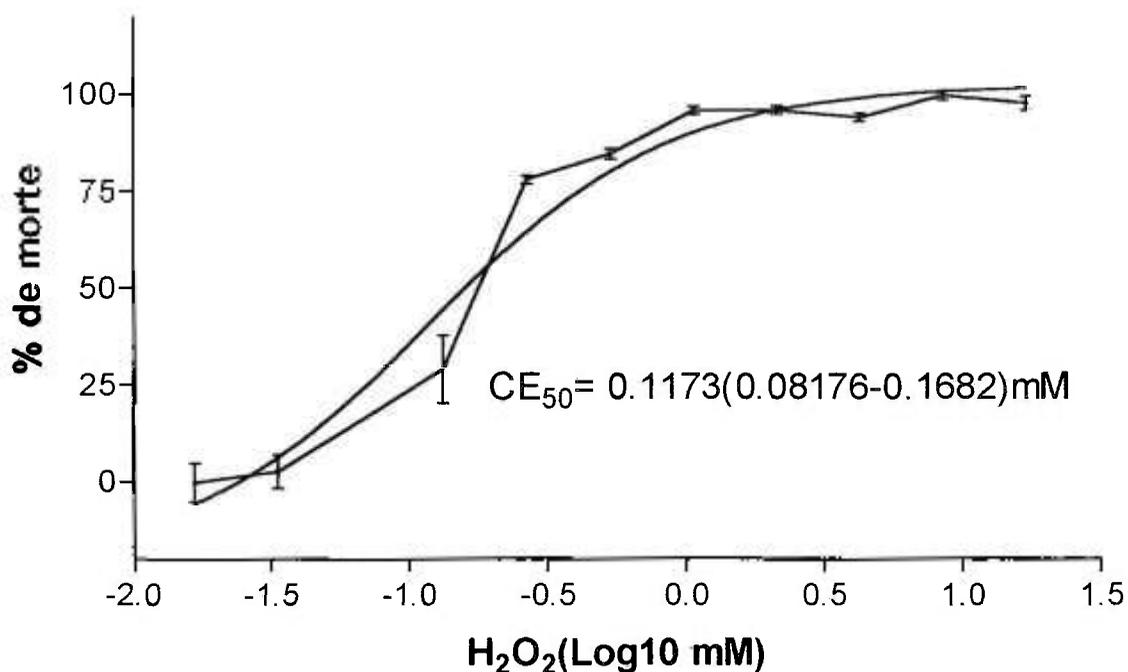


Figura 25: Curva da porcentagem de morte de *Leishmania (Leishmania) amazonensis* provocada por peróxido de hidrogênio.

Observa-se que uma concentração de apenas 0,1173 mM (3,9 µg/ml) peróxido de hidrogênio foi suficiente para provocar a morte de 50% dos parasitas.

5. DISCUSSÃO

No presente estudo, a metodologia empregada para a triagem da ação farmacológica contra *Leishmania (L.) amazonensis*, demonstrou-se eficaz e precisa.

Habitualmente, os testes para triagem de ação leishmanicida envolvem a contagem de parasitas, que consiste em sistemas de alto consumo de tempo e de pessoal treinado, limitando a execução dos testes e sua reprodutibilidade, ou à incorporação de precursores radiativos, sempre com limitações técnicas e de custo (BASSELIN *et al*, 1996). Em nossos experimentos, isso não ocorreu, pois o ensaio de viabilidade utilizando o MTT possibilitou testar uma maior faixa de doses, permitindo a construção de curvas dose resposta de maior precisão. Este sistema já havia sido utilizado por outros autores com igual sucesso (ALFIERI *et al*, 1988; KIDERLEN & KAYE 1990), mas sempre utilizando menor número de produtos em seus testes.

Assim, realizou-se um estudo comparativo, entre venenos de mais de uma dezena de diferentes espécies de serpentes, na forma nativa e irradiada, quanto ao poder inibitório do crescimento de parasitas da espécie *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, verificando-se que a maior parte dos venenos propostos para o estudo apresentaram atividade antiparasitária.

A maioria dos venenos australianos testados, considerados os venenos mais tóxicos do mundo (FRY, 1999), apresentaram atividade leishmanicida. No entanto, esta atividade não foi proporcional à toxicidade de cada veneno em

particular, uma vez que venenos do gênero *Notechis sp*, por exemplo, que são considerados muito tóxicos (TAN & PONNUDURAI, 1990), não apresentaram tal atividade.

As atividades estudadas estavam também presentes em venenos de serpentes de outras famílias, provenientes de diversas partes do mundo, como por exemplo nos gêneros *Agkistrodon* e *Bothrops*, que pertencem à família *Viperidae*. Ensaio preliminares também demonstraram a ausência do efeito leishmanicida em veneno de *Crotalus durissus terrificus* (N. Nascimento, com. pessoal), altamente tóxico e que tem atividade predominantemente neuromuscular (CARDI et al, 1997).

Nossos testes mostraram portanto, que a atividade leishmanicida não estava relacionada à maior toxicidade dos venenos, que geralmente está relacionada a uma ação em sistema nervoso ou muscular; mas parece ser dependente de outras frações proteolíticas ou enzimáticas, como as presentes nos venenos botrópicos. Coincidentemente, os venenos dos gêneros *Notechis*, *Oxyuranus* e *Pseudonaja*, não apresentaram atividade antileishmania.

As espécies cujos venenos apresentaram atividade pertencem aos gêneros *Acanthophis*, *Agkistrodon*, *Hoplocephalus*, *Bothrops*, *Pseudechis* e *Naja*, geralmente compostos por sistemas proteolíticos complexos e que apresentam ação local predominante em seu efeito tóxico, geralmente com menor ação sistêmica (HOMMA & TU, 1971).

As atividades bactericida (SKARNES, 1970) e antiparasitária (FERNANDEZ-GOMES et al, 1994) de alguns componentes presentes em venenos de serpentes tem sido investigada. STILES e colaboradores, em 1991,

relataram que determinadas frações do veneno da espécie *Pseudechis australis* apresentavam um efeito bactericida e que tal atividade está relacionada à atividade L- aminoácido oxidase (L-AO), o que nos levou a eleger esta ação enzimática na procura do princípio ativo existente nos venenos com atividade antileishmania.

No presente estudo, os venenos que apresentavam a atividade antileishmania, coincidiam com os que apresentavam coloração amarelada na sua forma liofilizada ou cristalizada, corroborando a informação de que a enzima L-AO é o componente responsável pela cor amarela em alguns venenos de serpentes, devido à presença do grupamento FAD como grupo prostético (IWANAGA & SUZUKI, 1979).

Determinados aminoácidos, como por exemplo a L- leucina, são substratos da enzima L-AO que, na presença de oxigênio, sofre uma desaminação resultando em um α - cetoácido, amônia e peróxido de hidrogênio(TAN & SAIFUDDIN, 1991). No experimento realizado, onde a L-leucina é o substrato da L-AO, o peróxido de hidrogênio sofre a ação da peroxidase presente no sistema, forma um oxigênio reativo que reage com o OPD resultando em uma coloração amarelada quando a enzima está presente. O ensaio permitiu determinar que a atividade da enzima L-AO presente nas diversas espécies de serpentes era diretamente proporcional à atividade antileishmania, sugerindo que a mesma pudesse estar envolvida com o mecanismo de morte dos parasitas.

Um estudo comparativo do perfil eletroforético destas amostras indicou que os venenos com atividade antileishmania apresentavam uma banda com peso

molecular aproximado de 60 kDa. Sabe-se que a massa molecular, observada para L-AO de diversas espécies de serpentes, apresenta uma variação de 60kDa como estrutura monomérica a 150kDa como uma estrutura dimérica (TAN & SWAMINATHAN, 1992). Esta seria portanto mais uma característica dos venenos com atividade leishmanicida sugerindo que a enzima L-AO está relacionada com o mecanismo de morte dos parasitas.

Entretanto, foi notado que, apesar dos venenos de *Bothrops jararaca* e *Agkistrodon bilineatus* apresentarem banda fraca na região de 60 KDa, eles inibem o crescimento do parasita. Por outro lado, o veneno de *Naja mossambica*, que apresentou banda forte, é desprovido tanto da atividade L-AO como de atividade antileishmania. Esse fato sugere que não apenas o componente de peso molecular em torno de 60kDa é responsável pela atividade antileishmania, mas que existe pelo menos mais um componente no veneno, com o mesmo peso molecular. Isto implicaria em maior complexidade da purificação do princípio ativo, caso este tipo de estudo fosse ensejado.

Estudos anteriores demonstraram que a radiação ionizante é muito eficiente no processo de destoxicação de certos venenos ofídicos quando comparada às outras técnicas (NASCIMENTO, 1995; SPENCER, 1995; GUARNIERI, 1992; CLISSA, 1999), por conseguir associar a diminuição da toxicidade com manutenção das propriedades imunológicas da amostra irradiada, sem a adição de quaisquer substâncias, sendo que a melhor dose para venenos, em solução, é a de 2 kGy (MURATA, 1990).

Baseando-se nestas informações, utilizou-se a radiação ionizante como ferramenta de destoxicação dos venenos ofídicos que apresentaram atividade

antileishmania. Como resultado, ocorreu uma redução da atividade antileishmania na maior parte dos venenos, sendo que os referentes às espécies *Naja melanoleuca* e *Naja mossambica* apresentaram baixa ou nenhuma atividade após a irradiação.

Deve-se lembrar que a radiação ionizante pode provocar mudanças nas propriedades biológicas e antigênicas de uma proteína (NASCIMENTO *et al*, 1996) devido às diversas mudanças químicas e alterações nas propriedades físico-químicas (ALEXANDER & HAMILTON, 1961). Este fato sugere que a radiação ionizante poderia estar afetando a(s) proteína (s) responsável (is) pelo mecanismo de morte do parasita.

No entanto, a irradiação preservou parcialmente a atividade L-aminoácido oxidase dos venenos que apresentaram atividade antileishmania, apesar desta atividade ter sido reduzida de forma não muito significativa em algumas das espécies. As *Leishmanias* apresentam sistemas de salvamento para a ação de radicais livres e peróxido hidrogênio como os gerados pela L-AO, especialmente nas formas amastigotas, onde uma atividade catalase é considerada até um mecanismo de escape à ação dos mecanismos efetores presentes em macrófagos (CHAN *et al*, 1998). Assim, a produção de radicais livres pelo sistema enzimático presente no veneno pode ter sido contrabalançado parcialmente pelas *Leishmanias*, resultando em menor atividade leishmanicida, na presença de atividade enzimática menos eficiente.

Não foi feita uma tentativa de correlacionar quantitativamente a produção de radicais livres pela radiação ionizante e a atividade leishmanicida de cada veneno. Isto poderia ser estudado pelo uso de scavengers específicos de cada

radical livre produzido no processo de irradiação, com o intuito de modular os efeitos da radiação ionizante (GUARNIERI, 1992 ;ANDRIANI, 1995).

Com o objetivo de verificar a toxicidade dos venenos ativos contra a *Leishmania (Leishmania) amazonensis*, sobre células de mamíferos, foram realizados testes em células da linhagem LLCMK₂, mostrando também uma ação lesiva sobre estas células. Estes testes demonstraram que a maioria dos venenos foram mais tóxicos para os parasitas do que para as células LLCMK₂, quando comparados as CE₅₀. Observou-se ainda que a radiação afetou, em pequenas proporções, a toxicidade dos venenos, como pode ser observado na figura 26. A pressuposição de uma ação seletiva sobre as leishmanias é fundamental para permitir qualquer desenvolvimento de uma ação farmacológica dos venenos estudados.

Para verificar se a atividade antileishmania dependia somente do peróxido de hidrogênio produzido pela L-AO, foram realizados ensaio de atividade na presença de enzima catalase. Como foi possível observar nos resultados, a grande maioria dos venenos ainda preservaram, em parte, a atividade antileishmania, sugerindo que esta atividade não se deve exclusivamente ao peróxido de hidrogênio e que outros componentes dos venenos poderiam estar agindo sobre o parasita.

A *Leishmania*, na presença de catalase, não apresenta alteração significativa em seu crescimento, sugerindo que o peróxido de hidrogênio produzido é fundamental para a inibição de seu crescimento, mas outros fatores existentes nos venenos também poderiam afetar a viabilidade dos parasitas. Por outro lado, a catalase, não interferiu na ação dos venenos sobre as células

LLCMK₂, sugerindo que a agressão dos venenos às células de mamíferos pode depender de outros fatores não estudados de cada veneno, não relacionados diretamente a produção de H₂O₂, corroborando o conceito da existência de outros fatores interagindo na ação antileishmania.

Existem alguns autores que sugerem que o peróxido de hidrogênio produzido pela enzima L-AO induz à apoptose em algumas linhagens de células (SUHR & KIM, 1999) enquanto outros, sugerem que a ação principal da enzima é a lise da membrana celular, semelhante ao processo de morte celular de células de mamíferos, induzidas por radicais livres, incluindo o peróxido de hidrogênio, que provoca um estresse oxidativo que leva às atividades proteolíticas dentro da célula e afeta as funções mitocondriais (KROBTSCH, 1998). A partir de uma curva de porcentagem de morte utilizando peróxido de hidrogênio exógeno, onde a CE₅₀ obtida foi de aproximadamente 3,9µg/ml, foi possível determinar que o peróxido de hidrogênio está efetivamente envolvido no mecanismo de morte do parasita, comparando-se aos resultados das CE₅₀ obtidas com os venenos sobre *L.(L.) amazonensis*.

Como já foi citado, a enzima L-AO tem como substrato certos aminoácidos, (SANCHÉZ & MAGALHÃES, 1991). Verificou-se então que a atividade L-AO é dependente dos aminoácidos presentes no meio de cultura, quando os venenos juntamente com os parasitas, foram incubados em solução de HBSS sem a adição de aminoácidos. Com exceção dos venenos de *Naja mossambica*, *Naja melanoleuca*, e *Pseudechis colletti* cuja sobrevivência detectada no ensaio de atividade antileishmania, foi menor que 50% do valor total, os venenos das espécies *Bothrops jararaca*, *Hoplocephalus stephensi*, *Pseudechis guttattus* e

Pseudechis porphyriacus, perderam sua atividade antileishmania na ausência de aminoácidos, mostrando que esta ação é dependente deste tipo de substrato. Mas, tendo ocorrido a manutenção parcial da atividade antileishmania em alguns venenos, reforça-se que outros componentes do veneno podem estar colaborando para a atividade antileishmania.

Cabe ressaltar que, do ponto de vista toxicológico, a enzima L-AO tem pouca importância (JIMENEZ-PORRAS, 1970) e este fator, associado ao processo de destoxicação modulada utilizando a radiação ionizante, pode levar a uma forma de tratamento da leishmaniose menos tóxica e mais eficaz do que os propostos atualmente.

Evidentemente, outras abordagens metodológicas no desenvolvimento de fármacos ativos para esta importante endemia podem ser conseqüências indiretas deste tipo de estudo. As enzimas são, hipoteticamente, fábricas biológicas de produtos de interesse e, embora em nosso estudo, o fator mais ativo tenha sido um radical livre ou peróxido de hidrogênio, a possibilidade de ação do veneno e suas enzimas transformando um substrato inativo em produto ativo seria interessante. Isto permitiria o processamento "ex vivo" de substratos pelo veneno, gerando o princípio ativo passível de utilização sem as conseqüências imunológicas da aplicação de antígenos complexos em um hospedeiro, por tempo prolongado com conseqüentes reações imunes. Um exemplo seria se o cetoadido produzido pela L-AO fosse de fato o princípio ativo e não o peróxido de hidrogênio. Este tipo de pensamento reforça o estudo de métodos alternativos na produção de novos fármacos.

CE₅₀ de diversos venenos ofídicos sobre *L. (L.) amazonensis* e células LLCMK2

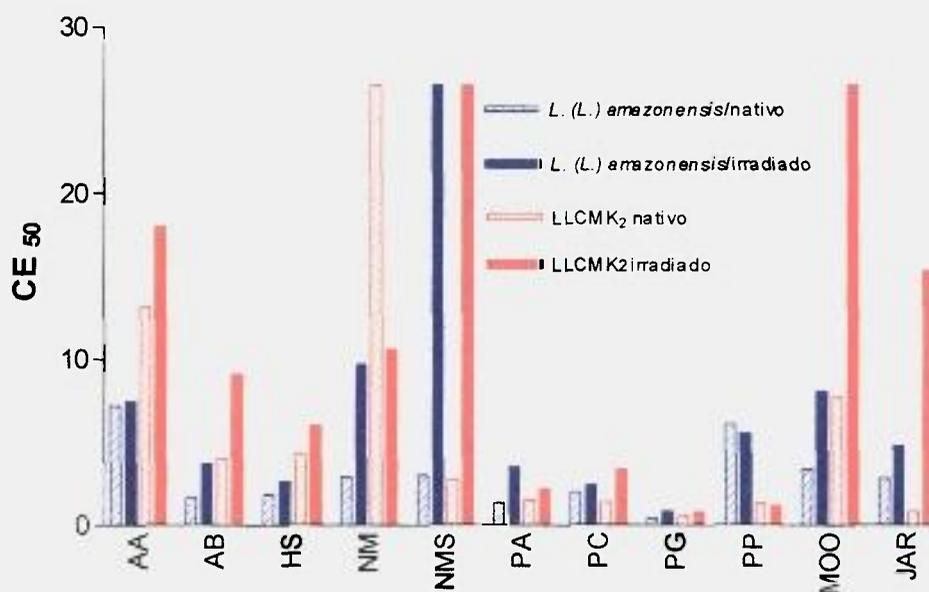


Figura 26: Gráfico comparativo da CE₅₀ de venenos nativos e irradiados de serpentes sobre *Leishmania (Leishmania) amazonensis* e células de mamíferos da linhagem LLCMK₂: **AA-** *Acanthophis antarcticus*, **AB-** *Agkistrodon bilineatus*, **JAR-** *Bothrops jararaca*, **MOO-** *Bothrops moojeni*, **HS-** *Hoplocephalus stephensi*, **NM-** *Naja melanoleuca*, **NMS-** *Naja mossambica*, **PA-** *Pseudechis australis*, **PC-** *Pseudechis colletti*, **PG-** *Pseudechis guttatus*, **PP-** *Pseudechis porphyriacus*, **NAN-** *Notechis ater niger*, **NS-** *Notechis scutatus*, **OM-** *Oxyuranus microlepidotus*, **OS-** *Oxyuranus scutellatus* e **PT-** *Pseudojana textilis*.

Considerando os fatores abaixo:

- Dentre as diferentes manifestações clínicas da leishmaniose, a forma cutânea é a mais freqüente de todas (WHO, 1999), sendo caracterizada como uma doença comum em regiões tropicais e sub- tropicais do mundo, onde se situam países em desenvolvimento ou sub- desenvolvidos, com uma população que apresenta baixa imunidade devido às condições precárias de saúde.
- O tratamento da doença apresenta muitas dificuldades, pois a maior parte dos fármacos, como por exemplo os antimoniais pentavalentes e a pentamidina, apresentam efeitos colaterais como náuseas, diarréia, convulsões e algumas vezes cardiotoxicidade (PITZER *et al*, 1998). Fatores como a dificuldade de administração e o alto custo destes fármacos também constituem um grande problema para o tratamento da leishmaniose (IBRAHIM *et al*, 1994). A aquisição de resistência pelo parasita é um fator crucial, pois já foram observadas, em alguns casos, cepas resistentes devido às baixas dosagens de fármacos e ao tratamento descontínuo de pacientes (BALAÑA-FOURCE *et al*, 1998).
- A introdução de fármacos novos introduzidos no mercado mundial, onde menos de 1% das inovações terapêuticas são destinadas à doenças tropicais, que inclui dentre outras a própria leishmaniose (TROUILLER & OLLIARO, 1999).

- A radiação ionizante como ferramenta moduladora de destoxicação de venenos ofídicos com atividade antileishmania.

Este estudo favorece a utilização dos venenos de serpentes para o desenvolvimento de novos compostos que apresentam a capacidade de inibir o crescimento da *Leishmania* visando alcançar uma terapia alternativa para o tratamento da doença.

6. CONCLUSÕES

1. Os venenos das espécies *Acanthophis antarcticus*, *Agkistrodon bilineatus*, *Hoplocephalus stephensi*, *Naja melanoleuca*, *Naja mossambica*, *Pseudechis australis*, *Pseudechis colletti*, *Pseudechis guttatus*, *Pseudechis porphiryacus*, *Bothrops moojeni* e *Bothrops jararaca* apresentaram atividade antileishmania e atividade L-aminoácido oxidase, sendo o veneno da espécie *Pseudechis guttatus* o mais ativo.
2. Os venenos das espécies *Notechis ater niger*, *Notechis scuttatus*, *Oxyuranus microlepidotus*, *Oxyuranus scutellatus* e *Pseudonaja textilis* não apresentaram atividade antileishmania e atividade L-aminoácido oxidase.
3. Os venenos com atividade antileishmania apresentaram um perfil eletroforético semelhante com uma banda em comum de peso molecular em torno de 60 kDA.
4. A radiação ionizante provocou alterações nestes venenos, reduzindo a toxicidade em células LLCMK₂.
5. Os venenos com atividade antileishmania apresentaram menor atividade em células de mamíferos apesar da atividade não depender exclusivamente do peróxido de hidrogênio produzido pela L-AO.
6. A atividade antileishmania depende parcialmente de aminoácidos exógenos.

7. O veneno da espécie *Naja melanoleuca* apresentou um melhor perfil: mostrando-se pouco tóxico para células de mamíferos e mais tóxico para os parasitas.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ANDRIANI, E. **Irradiação da crotoxina em Solução Aquosa: Influência Das principais espécies reativas nas alterações estruturais, biológicas e imunológicas.** São Paulo, 1995. (Dissertação de Mestrado), Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
2. ALBANESE, G., GIORGETTI, P. SANTAGOSTINO, L., CRIPPA, D., SALA, G. Cutaneous leishmaniasis: treatment with itraconazole. **Arch. Dermatol.**, v.69, p.14-17, 1989.
3. ALEXANDER, P., HAMILTON, L.D.G. Irradiation of proteins in the solid state. II-Chemical changes produced in bovine serum albumin. **Radiation Research**, v.13, p.214-233, 1961.
4. ALEXANDER, J., RUSSEL, D. G. Parasite antigens, their role protection, diagnosis and escape: the Leishmaniasis. **Curr. Top. Microbiol. Immunol.**, v.20, p.43-63, 1985.
5. ALFIERI, S.C., RAMAZEILLES, C., ZILBERFARB, V. GALPIN, I. NORMAN, S. E., RABINOVITCH, M. Proteinase inhibitors protect *Leishmania amazonensis* amastigote from destruction by amino acid esters. **Biochem. Parasitol.**, v.29, p.191-201, 1988.
6. ALOOF-HIRSCH, S., DEVRIES, A., BERGER A. The direct factor lytic of cobra venom: purification and chemical characterization. **Biochim. Biophys. Acta**, v.154, p.53-60, 1968.

7. ALVAR, J., GUTIERREZ-SOLAR, B., MOLINA R., LÓPEZ-VÉLEZ R., GARCÍA-CAMACHO, A. MARTÍNEZ, P., LAGUNA, F., CERCENADO, E., GALMES A. Prevalence of *Leishmania infantum* among AIDS patients. **Lancet**, v. 339, p.1427, 1992.
8. ANDRILAO-ESCARSO, S.H., SOARES, A.M., RODRIGUES, V.M., MANCINI, A. C., REIS, M. L., BALLEJO, G. GIGLIO, J. R. Isolation and characterization of an arginine ester hydrolase from *Bothrops jararacussu* venom which induces contractions of isolated rat uterus. **Biochem. Mol. Biol. Int.**, v.47, n.4, p.699-706, 1999.
9. BADARÓ R., JOHNSON, W. D. Jr. The role of interferon-gamma in the treatment of visceral and diffuse cutaneous leishmaniasis. **J. Inf. Dis.**, v.167, suppl 1, p.13-17, 1993.
10. BALAÑA-FOURCE, R., REGUERA, R.M., CUBRÍA, C., ORDÓÑEZ, D. The pharmacology of Leishmaniasis. **Gen. Pharmac.**, v.30, p.435-443, 1998.
11. BARIDE, R.M., JAIN, S.D., GAITONDE, B.B. Biochemical studies on the toxoids of venoms of poisonous Indian snakes. **Indian J. Med. Res.**, v.72, p.571-576, 1980.
12. BASSELIN, M., LAWRENCE, F., ROBERT-GERO, M. Pentamidine uptake in *Leishmania donovani* and *Leishmania amazonensis* promastigotes and axenic amastigote. **Biochem. J.**, v.135, p.449-461, 1996.
13. BATES, P.A. Complete developmental cycle of *Leishmania mexicana* in axenic culture. **Parasitology**, v. 108, p.1-9, 1994.

14. BERG, K., ZHAI, L.; CHEN, M.; KHARAZMI, A.; OWEN, T.C. The use of a water-soluble formazan complex to quantitate the cell number and mitochondrial function of *Leishmania major* promastigotes. ***Parasitology Research***, v.80, p. 235-239, 1994.
15. BERMAN, J. D. Chemotherapy for leishmaniasis; biochemical mechanisms, clinical efficacy, and future strategies. ***Rev. Infect. Dis.***, v.10, p.560-586, 1998.
16. BLISHCHENCO, Yu, & KARELIN, A. A. Tubocurarin induces the wide spectrum of cytotoxic effects in tumor cells. ***Immunol Lett***, v.42, n.1-2, p.13-17, 1994.
17. 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.248-254, 1976.
18. BRITO, C., RAVEL, C., BASTIEN, P., BLAINEAU, C., PAGÉS, M., DEDET, J.-P., WINCKER, P. Conserved linkage groups associated with large-scale chromosomal rearrangements between Old World and New World *Leishmania* genomes. ***Gene***, v.222, p. 107-117, 1998.
19. 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.
20. CARDI, B. A., NASCIMENTO, N. ANDRADE, H.F. Jr. Irradiation of *Crotalus durissus terrificus* crotoxin with ⁶⁰Co gamma rays induces its uptakes by macrophages. ***Int. J. Radiat. Biol.***, v.73, n.5, p.557-564, 1997.

21. CARRUTHERS J., CARRUTHERS, A. The adjunctive usage of botulinum toxin. **Dermatol. Surg.**, v.24, n.11, p.1244-1247, 1998.
22. CHAN, C., GARFOTH, J., Mc KIE, J.H., JAOUHARI, R., SPEERS, P., DOUGLAS, K.T., ROCK, P.J., YARDLEY, V., CROFT, S.L., FAIRLAMB, A.L. Phenothiazine Inhibitors of thrypanotione reductase as potential antitrypanosomal and antileishmanial drugs. **J. Med. Chem.**, v.41, p. 148-156, 1998.
23. CHAPMAN, J. D. Radiation chemical studies with nitrofurazone as related to its mechanism of radiosensitization. **Radiat. Res.**, p.197-206, 1993.
24. CLISSA P.B., NASCIMENTO N., ROGERO J.R.- Toxicity And Immunogenicity of *Crotalus Durissus Terrificus* crotoxin treated with different doses of gamma rays. **Toxicon** v.37, p.1131-1141, 1999.
25. CONTE, E. Jr. Pharmacokinetics of intravenous pentamidine in patients with normal renal function or receiving hemodialysis. **J. Infect. Dis.**, v.163, p.169-175, 1991.
26. DALTRY, J.C., WOLFGANG,W., THORPE, R. S. Diet and snake venom evolution. **Nature**, v.379, p.537-542, 1996.
27. DANIEL, P.J., HENEINE, L.G., TAVARES, C.A., NASCIMENTO, M.C., HENEINE, I.F. Generation of protective sera by *Crotalus durissus terrificus* venom detoxified by controlled iodination. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v.20, n.6, p.731-720, 1987.
28. DESJEUX, P. Leishmaniasis, public health aspects and control. **Clin. Dermatol.**, v. 14, p.417-423, 1996.

29. FERNANDEZ-GOMES, R., ZERROUK, H., SEBTI, F., LOYENS, M., BENSLIMANE, A., OUAISSI, M. A. Growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania donovani infantum* by different snake venoms: preliminary identification of proteins from *Cerastes cerastes* venom which interact with the parasite. **Toxicon**, v.32, n.8, p.875-882, 1994.
30. FERREIRA, S.H. History of development of inhibitors of angiotensin I conversion. **Drugs**, v.30, p.1-5, 1985.
31. FINI, C., PALMERINI, C.A., DAMIANI, P., STOCHAJ, U., MANNHERZ, H.G., FLORIDI, A. 5'-nucleotidase from bull seminal plasma, chicken gizzard and snake venom is a zinc metalloprotein. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1038, n.1, p.18-22, 1990.
32. FLOWERS, H.H., GOUCHER, C.R. The effect of EDTA on the extent of tissue damage caused by the venoms of *Bothrops atrox* and *Agkistrodon piscivorus*. **Toxicon**, v.2, p.221-224, 1965.
33. FROBERT, Y., CRÉMINON, C., COUSIN, X., RÉMY, M-H, CHATEL, J-M, BON, S., BON, C. & GRASSI, J. Acetylcholinesterase from *Elapidae* snake venoms: biochemical, immunological and enzymatic characterization. **Biochem. Biophys. Acta**, v.1339, p.253-267, 1997.
34. FRY, B.G. Structure-function properties of venom components from australian elapids. **Toxicon**, v.37, p.11-32, 1999.
35. GARNHAM, P.C.C., Introduction. In: PETERS, W. & KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, v.1, Academic Press Inc., London, 1987.

36. GERLIER, D.; THOMASSET, N. Use of MTT colorimetric assay to measure cell activation. *J. Immunol. Methods*, v.119, p.203-210, 1986.
37. GOIHMAN-YAHR, M. American Mucocutaneous Leishmaniasis. *Dermatol. Clin.*, v.12, p.703-712, 1994.
38. GRASSET, E. Anavenomous and their use in the preparation of antivenom sera. *Trans. R. Soc. Trop. Med. Hyg.*, v.38, p.713-720, 1945.
39. GREENSTOCK, C. L. Redox processes in radiation biology and cancer. *Radiat. Res.*, v.86, n.2, p.196-211, 1981.
40. GROSCH, D.S., HOPYWOOD, L.E. *Biological effects of radiation*. New York, N.Y. Academic Press, 1979.
41. 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 (Doutoramento) - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
42. GUIDOLIN, R., DIAS DA SILVA, W., HIGASHI, H.G., CARICATI, C.P., LIMA, M.L.S.R., MORAES, J.F., PINTO, J. R., MARCELINO, J. R. Hipermurização de cavalos soroprodutores com venenos botrópicos e crotálico tratados por glutaraldeído. *Mem. Inst. But.*, v.51, p.85-90, 1989.
43. HARVEY, A.L., BRADLEY, K.N., COCHRAN, S.A., ROWAN, E.G., PRATT, J. A., QUILLFELDT, J. A., JERUSALINSKY, D. A. What can toxins tell us for drug discovery? *Toxicon*, v.36, n.11, p. 1135-1140, 1998.
44. HERRERA, E., YARLEQUE, A., CAMPOS, S., ZAVALETA, A. Efecto de la radiacion gamma sobre la actividad biologica y propiedades enzimaticas de los

- venenos de las serpientes *Lachesis muta muta* y *Bothrops atrox*. **Informe Nuclear**, v.3, p.1-14, 1986.
45. HERWADT, B.L. & BERMAN, J. D. Recommendations of treating leishmaniasis with stibogluconate (pentostam) and review of pertinent clinical studies, **Am. J. Trop. Med. Hyg.**, v.88, p.296-306, 1992.
46. HOMMA, M. & TU, A T. Morphology of local damage in experimental snake envenomation. **Br. J. Exp. Path.**, v.52, p.538-542, 1971.
47. IBRAHIM, M. E., HAG-ALI, M., EL-HASSAN, A.M., THEANDER, T. G., KHARAZMI, A. *Leishmania* resistant to sodium stibogluconate: drug-associated macrophage-dependent killing. **Parasitol Res.**, v. 80, p. 569-574, 1994.
48. IWANAGA, S., SUZUKI, T. Chemistry and Biochemistry of Snake Venoms. In: LEE, C-Y **Snake venoms, Handbook of Experimental Pharmacology**, v.52, p.61-158, New York, 1979.
49. JIMENEZ-PORRAS, J.M. Biochemistry of snake venoms. **Clinical Toxicology**, v.3, n. 3, p.389-431, 1970.
50. KANKONKAR, S. R., KANKONKAR, R.C., GAITONDE, B.B., JOSHI, S.V. Irradiated cobra (*Naja naja*) venom for biomedical applications. In: **Radioesterilization of Medical Products(IAEA)**, p.253-262, 1975.
51. KIDERLEN, A. P.; KAYE, P.M. A modified colorimetric assay of macrophage activation for intracellular cytotoxic against *Leishmania* parasites. **J. Immunol. Methods**, v.127, p. 11-18, 1990
52. KINI, R.M.& EVANS, H.J. A model to explain the pharmacological effects of snake venom phospholipases A₂, **Toxicon**, v.27, n.6, p.613-635, 1989.

53. KOCHOLATY, W.F., GOETZ, C. J., ASHLEY, B. D., BILLINGS, A.T. LEDFORD, E.B. Immunogenic response of the venoms of Fer de Lance, *Bothrops atrox asper*, and La Cascabella, *Crotalus durissus terrificus*, following photooxidative detoxification. **Toxicon**, v.5, p.153-158, 1968.
54. KROBITSCH, S., BRANDAU, S., HOYER, C. SCHMETZ, C., HUBEL, ^a, CLOS, J. Leishmania donovani heat shock protein 100. Characterization and function in amastigote stage differentiation. **J. Bio. Chem.**, v.13, n.11, p. 6488-6494, 1998.
55. LAEMMLI, U.K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head bacteriophage T4. **Nature**, v.227, p.680-685, 1970.
56. LAINSON, R. & SHAW, J.J. Evolution, classification and geographic distribution. In: PETERS, W., KILLICK-KENDRICK, R. **The Leishmaniasis in Biology and Medicine**, v.1, Academic Press Inc., London, p.1-120, 1987.
57. LATARJET, R. Rads and Gray - Becquerel and Curies. **Radiat. Res.**, v.141, p.105-107, 1995.
58. MARSDEN, P. D., NONATA, R. R. Mucocutaneous Leishmaniasis - A review of clinical aspects. **Rev. Soc. Bras. Med. Trop.**, v.9, n.6, p. 309-326, 1975.
59. MEIER, J. Venomous Snakes. In: STOCKER, K.F. **Medical use of Snake Venom Proteins**. Boca Raton, Boston: CRC, p.1-32, 1990.
60. MISHA, M., BISWAS, U.K., JHA, A.M., KHAN, A. B. Amphotericin versus stibogluconate in first line treatment of Indian Kala- Azar. **Lancet**, v.344, p.1599-1600, 1994.

61. MOROZ, C., GOLDBLUM, N., VRIES, A. Preparation of *Vipera palestinae* antineurotoxin using carboximethyl-cellulose-bound neurotoxin as antigen. **Nature**, v.16, p.697-698, 1963.
62. MOSSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation cytotoxicity assays. **J. Immunol. Methods** v.65, p.55-63, 1983.
63. MURATA, Y., NISHIKAWA, A. K., NASCIMENTO, N., HIGASHI, H.G., DIAS DA SILVA, W., ROGERO, J. R. Gamma radiation reduces the toxic activities of *Crotalus durissus terrificus* venom but does not affect their immunogenic activities. **Toxicon**, v.28. p.617, 1990.
64. NASCIMENTO, N. **Caracterização bioquímica e imunológica dos principais produtos gerados pela irradiação da crotoxina**. São Paulo: 1995 Tese (Doutoramento) – Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
65. NASCIMENTO, N., SPENCER, P.J., ANDRADE JR, H.F., GUARNIERI, M.C. & ROGERO, J. R. Effects of gamma radiation on snake venoms, **Radiat. Phys. Chem.**, v. 52, n.1-6, p.665-669, 1998.
66. 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, n.1, p. 123-131, 1996.
67. OLLIARO P. L., BRYCESON, A.D.M., Practical progress and new drugs for changing patterns of leishmaniasis. **Parasitol. Today**, v.9, p.323-328, 1993.

68. OUYANG C. & HUANG, T.F. Inhibition of platelet aggregation by 5'-nucleotidase purified from *Trimeresurus gramineus* snake venom. **Toxicon**, v.21, p.491, 1983.
69. PEARSON R. D., SOUSA, A.Q. *Leishmania* species: visceral (Kala-Azar), cutaneous and mucosal Leishmaniasis. In: MANDELL, DOUGLAS & BENNET'S (ed.) **Principles and Practices of Infectious Diseases**, 4^a ed., Editora Churchill Livingstone New York, v.2, cap. 254, p.2428-2442, 1995.
70. PESSATTI, M. L., FONTANA, J. D. FURTADO, M. F. D., GUIMARÃES, M.F., ZANETTE, L.R.S., COSTA, W.T. BARON, M. Screening of Bothrops snake venoms for L amino acid oxidase activity. **Appl Biochem Biotech**, v.51/52, p.197-210, 1995.
71. PITZER, K.K., WERBOVETZ, K.A., BRENDLE, J.J. & SCOVILL, J.P. Synthesis and biological evaluation of 4-chloro-3,5-dinitrobenzofluoride analogues as antileishmanial agents. **J. Med. Chem.**, v.41, n.24, p.4885-4889, 1998.
72. ROGERO J. R., NASCIMENTO, N. Detoxification of snake venom using ionizing radiation. **J. Venom. Anim. Toxins**, v.1, n.1, p.7-10, 1995.
73. ROSENFELD, G. Acidentes por animais peçonhentos In: VERONESI, R. (ed.) **Doenças infecciosas e parasitárias**, 8^a ed., Editora Guanabara Koogan, p.951-962, Rio de Janeiro, 1991.
74. SALAFRANCA, E.S. Irradiated cobra (*Naja naja philippinensis*) venom. **Int. J. Appl. Radiat. Isot.**, v.24, n.1, p.60, 1973.
75. SÁNCHEZ, E.O.F., 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.
76. SKARNES, R.C. L- aminoacid oxidase, a bacterial system. **Nature** v.225, p.1072-1073, 1970
77. SPENCER, P.J. **Alterações bioquímicas e imunológicas do veneno de *Bothrops jararacussu* irradiado com ⁶⁰Co.** São Paulo, 1995. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
78. STILES, B.G.; SEXTON, F. W., WEINSTEN, S.A. Antibacterial effects of different snake venoms: purification and characterization of antibacterial proteins of *Pseudechis australis* (Australian king brown or mulga snake) venom. **Toxicon**, v.29, p.1129-1141, 1991.
79. SUHR, S.M., KIM, D.S. Comparison of the apoptotic pathways induced by L- amino acid oxidase and hydrogen peroxide. **J Biochem (Tokyo)**, v.125, n. 2, p. 305-309, 1999.
80. TAN, N-H., PONNUDURAI, G. A comparative study of the biological properties of Australian elapid venoms. **Comp. Biochem. Physiol.**, v.97, n.1, p.99-106, 1990.
81. TAN, N.T., SAIFUDDIN, M.N. Substrate specificity of King Cobra (*Ophiophagus hannah*) venom L-amino acid oxidase. **Int. J. Biochem.** v.23, p.323-327, 1991.
82. TAN, N-H. & 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.

83. TEJASEN, P., OTTOLENGHI, A. The effect of ultra-violet light on the toxicity and the enzymatic and antigenic activities of snake venom. *Toxicon*, v.8, p.225-233, 1970.
84. TEMPONE, A.G. **Ação do veneno de *Bothrops moojeni* e sua fração L-aminoácido oxidase, submetida ao tratamento com raios gama de ^{60}Co , em *Leishmania spp.*** São Paulo, 1999. Dissertação de Mestrado - Instituto de Pesquisas Energéticas e Nucleares.
85. TORII, S., NAITO, M., TSURUO, T. Apoxin I, a novel apoptosis- inducing factor with L- amino acid oxidase activity purified from Western Diamond Black snake venom. *J. Biol. Chem.*, v.272, p.9539-9542, 1997.
86. TROUILLER, P., OLLIARO, P. L. Drug development output from 1975 to 1996: What proportion for tropical diseases, *Int. J. Infect. Dis.*, v.3, n.2, p.61-63, 1999.
87. WHITE, J., POUNDER, D. J., Fatal snakebite in Australia. *Am. J. Forensic Med. Pathol.* v.5, n.2, p.137-143, 1984.
88. WILLEMSE, G.T. Individual variation in snake venom. *Comp. Biochem. Physiol.*, n.61B, p.553-557, 1978.
89. (WHO) WORLD HEALTH ORGANIZATION, Division of Control of Tropical Diseases <http://www.who.ch/programmes/ctd/diseases/leis/leisdis.htm>. Acessado em 28/10/99.
90. XU Y. & KOOL, E. T. Chemical and enzymatic properties of bridging 5'-S-phosphodiester linkages in DNA. *Nucleic Acids Res.* v.26, n.13, p.3159-3164, 1998.