

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas  
de *Leishmania* spp**

Patrícia de Castilhos

Uberlândia – 2008

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas  
de *Leishmania spp***

Dissertação apresentada ao colegiado do  
Programa de Pós Graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas como parte da  
obtenção do título de mestre.

Patrícia de Castilhos

Maria Aparecida de Souza

Fabio de Oliveira

Uberlândia – 2008

Universidade Federal de Uberlândia

Instituto de Ciências Biomédicas

Programa de Pós Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas

**Efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas  
de *Leishmania* spp**

Dissertação apresentada ao colegiado do  
Programa de Pós Graduação em Imunologia  
e Parasitologia Aplicadas como parte da  
obtenção do título de mestre.

Patrícia de Castilhos

---

Maria Aparecida de Souza

Orientador

---

Fabio de Oliveira

Co – Orientador

Uberlândia – 2008



## Ficha Catalográfica

CASTILHOS, P.

Efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* sobre formas promastigotas de *Leishmania* spp./ Patrícia de Castilhos; Orientadora Maria Aparecida de Souza – Uberlândia, 2008. 68 p. : fig.

Dissertação (Mestrado - Programa de Pós-Graduação em Imunologia e Parasitologia Aplicadas – Instituto de Ciências Biomédicas da Universidade Federal de Uberlândia.

*Leishmania (Leishmania) amazonensis*; 2. *Leishmania (Viannia) braziliensis*; 3. *B. moojeni*; 5. Óxido Nítrico; 6. Viabilidade de Promastigotas.

## **Dedicatória**

*Dedico este trabalho aos meus pais e amigos que com compreensão, carinho e paciência me incentivaram nos momentos mais difíceis desta caminhada.*

## **Agradecimentos**

À CAPES/CNPq, pelo apoio financeiro que tornou possível meus estudos e pesquisas.

À professora Dra. Maria Aparecida de Souza pelos ensinamentos de vida e bancada, sendo um exemplo de profissionalismo, amizade e confiança. E que compreendeu minhas inseguranças, ajudando-me a superá-las e ensinando-me, acima de tudo, o sentido da palavra solidariedade.

Ao Prof. Dr. Fábio de Oliveira pela co-orientação, dedicação, incentivo e exemplo profissional. Mostrou-me com paciência, dedicação, amizade e ética que a ciência pouco significaria se não fosse transmitida.

A todos os professores do ICBIM, que me proporcionaram inestimáveis espaços de construção de conhecimento. Em especial, à Profa. Dra Janethe D. O. Pena, pela atenção, incentivo e gentileza dispensados, e por ter partilhado, de maneira tão próxima e amiga, dessa minha caminhada.

Aos funcionários do PPIPA, que sempre me deram um grande apoio durante todo o processo.

Aos amigos do BIOMOL, Camilla, Cristiano, Alexandre, Renata, Eneida, Cecílio, Claudinha, Lucas, Fernanda Japa, Fernanda Rocha, Raquel, pela amizade e apoio e os quais nos meus incansáveis dias de trabalho estiveram presentes, dividindo comigo as dores e as alegrias desse processo de construção em um convívio harmonioso.

Aos amigos do Laboratório de Biofísica, que me acompanharam nas cromatografias inacabáveis e sempre me apoiaram, e principalmente a Carol, por todo o trabalho, carinho e amizade que tivemos.

As minhas amigas, Fabiana, Thaise, Dalita, Lara e Lorena pela amizade, incentivo e eterno aprendizado e sempre me acolheram, nas angústias intelectuais ou nos sofrimentos pessoais e a Michele que mesmo distante tenho enormes saudades.

Um agradecimento muito especial ao Alan, por não ter permitido que eu me dobrasse às dificuldades, por dividir comigo os fracassos e os sucessos, pelo jeito bonito com que me vê, e pelo amor que compartilhamos.

À Moninha, pela compreensão, pela felicidade constante, pelo incentivo a sempre querer mais e que sempre partilhou, e partilha de todos os mínimos momentos, valorizando meu trabalho nos menores detalhes, e possibilitando meu desenvolvimento pessoal e profissional.

E aos meus pais, por esses anos todos de ensinamentos que me fizeram seguir um sonho e alcançá-lo, seguindo e guardando as essências de amor e carinho que me foram transmitidos. E por fazer do mundo um lugar mais fácil, estando sempre ao meu lado em todos os momentos bons e ruins, apoiando-me e incentivando a não parar nunca, sendo sempre mais forte.



## Sumário

1	Lista de Abreviaturas.....	11
2	Resumo .....	10
3	Abstract.....	12
4	Introdução.....	14
4.1	<i>Leishmania</i> .....	14
4.2	Peçonhas.....	24
5	Objetivos.....	29
5.1	Geral.....	29
5.2	Específicos.....	29
6	Materiais e Métodos.....	30
6.1	Obtenção das peçonhas.....	30
6.2	Fracionamento da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> e Frações.....	30
6.2.1	Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de <i>Bothrops moojeni</i> em gel de DEAE (-) Sephacel 30	
6.2.2	Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 das Frações obtidas .....	31
6.3	Determinação quantitativa de proteínas.....	31
6.4	Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para a determinação do peso molecular.....	31
6.5	Parasitas.....	32
6.6	Tratamento das formas promastigotas de <i>Leishmania</i> com peçonha <i>Bothrops moojeni</i> e suas Frações.....	33
6.7	Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT .....	34
6.8	Dosagem de Óxido Nítrico pelo Método de Griess.....	34
6.9	Animais.....	35

6.10	Infecção experimental em camundongos.....	35
6.11	Evolução da lesão.....	36
6.12	Análises Estatística .....	36
7	Resultados.....	37
7.1	Fracionamento da peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> e suas Frações protéicas.....	37
7.1.1	Cromatografia de Troca Iônica (DEAE (-) Sephacel) e SDS-PAGE das Frações protéicas obtidas	37
7.2	Cromatografia de Exclusão Molecular (Sephadex G-75) e SDS-PAGE das subFrações protéicas da Fração E5.....	39
7.3	Análise do efeito da peçonha de <i>B. moojeni</i> e suas Frações protéicas em <i>Leishmania</i> .....	41
7.4	Análise da produção de óxido nítrico por promastigotas de <i>Leishmania</i> após tratamento com peçonha de <i>Bothrops moojeni</i> e suas Frações protéicas.....	46
7.5	Avaliação do efeito do tratamento com peçonha e Fração E5 na evolução da lesão .....	48
8	Discussão.....	50
9	Conclusão.....	56
10	Referencias Bibliograficas .....	57

## 1 Lista de Abreviaturas

*L. ama* ou *L. a* – *Leishmania amazonensis*

*L. braziliensis* ou *L. b* – *Leishmania braziliensis*

*B. moojeni* – *Bothrops moojeni*

NO – óxido nítrico

iNOS – óxido nítrico sintase

PAGE – eletroforese em gel de poliacrilamida

SDS – dodecil sulfato de sódio

MTT – 3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolium-Bromidico

IFN- $\gamma$  - interferon Gama

TNF- $\alpha$  - fator de necrose tumoral

MHC - Complexo de histocompatibilidade principal

Th1 / Th2 – reposta Linfócitos T helper 1 / Linfócitos T helper 2

LPG – lipofosfoglicana

GP63 – glicoproteína com peso molecular de 63 kDa

OMS – organização mundial da saúde

PLA2 – fosfolipases A2

AMBIC – tampão bicarbonato de amônio

BHI – Brain Heart Infusion

ABS – absorvância

NEED –  $\alpha$  –Naftiletienoaminohidrocloro

PBS – salina tamponada com fosfato

PH8 – *Leishmania amazonensis*

M2903 – *Leishmania braziliensis*

## 2 Resumo

O estudo do tratamento de doenças infecciosas vem desenvolvendo ferramentas alternativas e muitas substâncias estão sendo testadas no tratamento de parasitoses, como Leishmanioses. Com esta proposta, a peçonha de serpentes tem sido estudada como droga capaz de alterar a viabilidade de parasitos. Neste trabalho, foi avaliado o efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* e suas Frações protéicas na viabilidade, na produção de NO, na infectividade e nas proteínas de promastigotas de *Leishmania* 'in vitro'. A peçonha de *Bothrops moojeni* foi fracionada em cinco Frações (E1 a E5) por cromatografia de troca iônica e usadas no tratamento de promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis*. A viabilidade foi analisada utilizando-se o MTT como substrato e a produção de óxido nítrico foi determinada no sobrenadante das culturas dos parasitos pelo método de Griess. Foi observado que a Fração E5 inibe fortemente a produção de NO em diferentes concentrações em *L. amazonensis*, enquanto em *L. braziliensis* a produção de NO apresentou aumento. Também foi observado que a peçonha inibe a viabilidade de ambos parasitos de forma dose-dependente, enquanto a Fração E5 inibe a viabilidade de *L. amazonensis*. Além disso, os parasitos tratados com peçonha apresentaram a proteína de 64 kDa de *L. (L.) amazonensis* aparentemente degradada em duas outras proteínas de 56 e 51 kDa respectivamente. Quando *Leishmania* spp foi tratada com Fração E5 e com anfotericina B não foi observado nenhuma alteração no perfil eletroforético dos parasitos. E após os estudos com a Fração E5 obtida na cromatografia de troca iônica, a mesma foi eluída em cromatografia de exclusão molecular e foram obtidos seis novos picos de Frações protéicas (E5G1 a E5G6). Estes foram testados na viabilidade celular de *Leishmania (L.) amazonensis* e o parasito somente foi sensível às subFrações E5G1 ( $\geq 0.156 \mu\text{g}$ ) e E5G5 ( $\geq 0.313\mu\text{g}$ ).

Adicionalmente foram analisados o efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* e da Fração E5 na progressão da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*. Durante o período de acompanhamento da evolução da lesão (6 semanas), verificou-se que a espessura das patas dos animais infectados com parasitos tratados até este período, não aumentou em relação à pata contralateral não infectada. Assim, demonstramos que peçonha de *Bothrops moojeni* e suas Frações protéicas alteram o perfil protéico e reduzem a viabilidade celular e a produção de NO por *Leishmania*, levando a diminuição da infectividade dos parasitos tratados, observados pela ausência de lesão nas patas dos camundongos inoculados com parasitos tratados com as respectivas drogas.

Palavras Chave - *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *B. moojeni*; Óxido Nítrico; Viabilidade de Promastigotas.

### 3 Abstract

In order to develop alternative tools to subdue infectious diseases, several substances have been tested toward treatment of parasitoses, such as *Leishmaniasis*. For this purpose, snake venoms have been used as future drugs that disrupt the viability of protozoan. In this report, we evaluated the effect of *Bothrops moojeni* venom and its fractions on viability, protein profile, infectivity and nitric oxide production of *Leishmania* promastigotes 'in vitro'. *Bothrops moojeni* venom was fractionated into five protein fractions (E1 to E5) by ion exclusion chromatography and used to treat on *L. (L.) amazonensis* and *L. (V.) braziliensis* promastigote forms. The viability of *Leishmania* promastigotes was evaluated by MTT test and nitric oxide production was detected in supernatants of *Leishmania* culture. It was observed that E5 fraction strongly inhibited NO production in different concentrations in *L. amazonensis*, while in *L. braziliensis* the NO production was enhance in ever concentration. It was also observed that crude venom of *B. moojeni* inhibited the viability of the both parasites in a dose dependent manner. However the E5 fraction only inhibited the viability of *L. amazonensis*. Also a peptide of 64 kDa of *L. (L.) amazonensis* was apparently degraded in other two peptides with 56 and 51 kDa respectively. Moreover, when *Leishmania* spp was treated with E5 fraction and amphotericin B was not observed degradation of proteins. And after studies with the E5 fraction in DEAE (-) Sephacel, it was realized the exclusion cromatography and was obtained six new fractions (E5G1 and E5G6) and the cellular viability *Leishmania (L.) amazonensis* was sensitive to E5G1 ( $\geq 0.156 \mu\text{g}$ ) and E5G5 ( $\geq 0.313\mu\text{g}$ ). Adicionaly, it was analyzed the effect of *Bothrops moojeni* venon and the E5 fraction in the lesion progression of BALB/c mice infected with *L. amazonensis* and during the following period of lesion evolution (six weeks) it was verified that the thickness of the footpads

of all infected animals with pre treated parasites did not increase in comparison to the non infected contralateral footpad. Thus, we demonstrated that *Bothrops moojeni* venom inhibited NO production, altered the protein profile and reduced the viability and infectivity of *Leishmania* promastigotes '*in vitro*'.

KeyWords - *Leishmania (Leishmania) amazonensis*; *Leishmania (Viannia) braziliensis*; *B. moojeni* venom; Nitric oxide; Promastigote viability.



## 4 Introdução

### 4.1 *Leishmania*

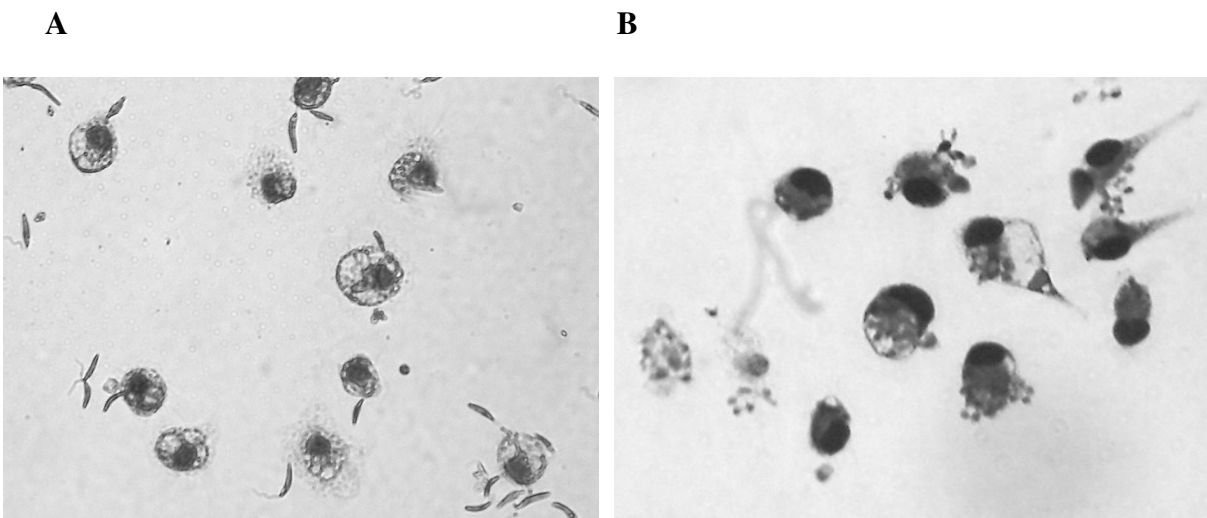
As Leishmanioses constituem um grupo de doenças zoonóticas, endêmicas e tropicais, considerada geralmente relacionada à pobreza (ALVAR, et al., 2006) e que acomete tanto o homem quanto animais. Afetam a pele, mucosa ou vísceras, resultantes do parasitismo dos macrófagos pelo protozoário flagelado do gênero *Leishmania*, inoculado pela picada de fêmeas de flebotomíneos (JARDIM, 2001). São encontradas em cerca de 88 países no mundo, a maioria se encontram nos trópicos e subtropicais, afetando 12 milhões de pessoas no mundo e aproximadamente 350 milhões de pessoas moram em áreas de risco (PALATNIK-DE-SOUZA, 2008). Mais de 90% dos casos de leishmaniose cutânea ocorrem no Afeganistão, Algéria, Brasil, Iran, Iraque, Peru, Arábia Saudita e Síria. E mais de 90% dos casos de leishmaniose visceral aparecem em Bangladesh, Brasil, Índia, Nepal e Sudão (COSTA et al., 2007).

No Brasil, em 2002, todos os estados apresentaram casos de leishmaniose tegumentar e a leishmaniose visceral atinge cerca de dezenove estados, principalmente os da Região Nordeste, onde se concentram 87% dos casos (BAILEY; LOCKWOOD, 2007). Em ambos os casos vêm ocorrendo uma expansão da doença. Nesse sentido a leishmaniose tem se tornado uma doença de grande preocupação na saúde pública e muitos estudos surgem como forma de apresentar compostos que possam interferir na viabilidade do parasito (BRASIL, 2000).

As Leishmanioses são consideradas de transmissão essencialmente silvestres e em ambientes rurais e o homem é apenas um hospedeiro acidental das várias espécies potencialmente patogênicas. Hoje apresentam mudanças no padrão de transmissão em

decorrência das modificações sócio-ambientais, como o desmatamento e o processo migratório caracterizado pelo êxodo rural, levando o homem para as periferias das grandes cidades (COSTA et al., 2007). A diferenciação da dinâmica de ocorrência das diferentes Leishmanioses no mundo é devido às variáveis relacionadas aos parasitos, aos vetores, aos ecossistemas e aos processos de produção de uso do solo (BERMAN, 1997).

O gênero *Leishmania* pertence à ordem Kinetoplastida, à família Trypanosomatidea e agrupa espécies de protozoários unicelulares, digenéticos (heteroxenos), e é caracterizado pela presença de uma organela rica em DNA, semelhante à mitocôndria, o cinetoplasto (LODGE; DESCOTEAUX, 2005). Estes protozoários parasitos podem se apresentar de duas formas: uma presente no intestino médio de hospedeiros invertebrados, que possui flagelo único, núcleo no terço médio da célula e cinetoplasto em posição mais anterior, denominada **promastigota** (Fig. 1A); ou outra, presente nos vacúolos parasitóforos no interior de macrófagos do hospedeiro vertebrado, não apresenta flagelo livre, possui forma esférica, núcleo na posição central e cinetoplasto adjacente ao mesmo, denominada **amastigota** (Fig. 1B) (MICHALICK, 2005). Este gênero compreende muitas espécies epidemiologicamente diversas e complexas.



**Figura 01** – Ilustração das formas promastigotas de *Leishmania* spp (A) e das formas amastigotas (B).

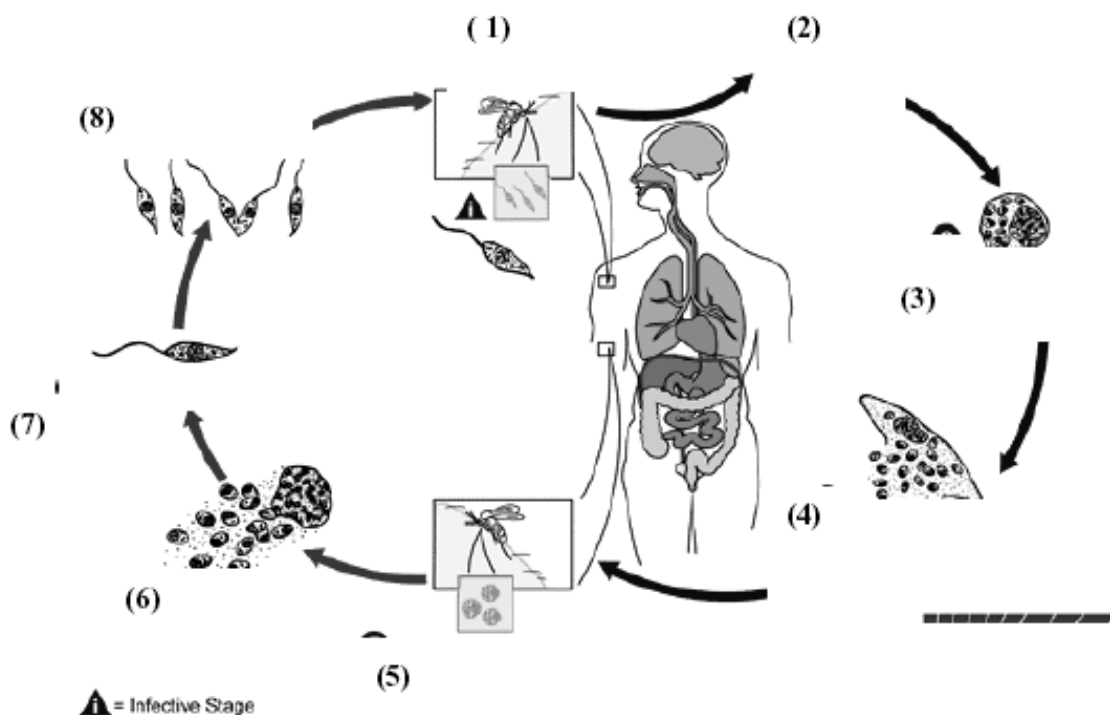
As Leishmanioses podem se manifestar em três principais tipos de doenças: visceral, cutânea e mucocutânea. A Leishmaniose visceral ou calazar caracteriza-se por lesões em órgãos internos (fígado e baço) e pode ser fatal se não tratada. A leishmaniose cutânea apresenta lesões com bordas elevadas e pode apresentar-se nas formas, localizada, disseminada (numerosas lesões em várias áreas do corpo) ou difusa. A leishmaniose mucocutânea inicialmente apresenta lesões na pele e mucosas, com comprometimento mucoso que ocorre por extensão da lesão ativa na pele situada próxima de mucosas (LYNN; MCMASTER, 2008). Essas manifestações são resultados da infecção por diferentes espécies do parasito.

LAINSON E SHAW, 1987, propuseram a divisão do gênero *Leishmania* em dois subgêneros: *Viannia* e *Leishmania*, seguindo as diferenciações do parasito no desenvolvimento nos vetores naturais, no meio de cultura e na pele de hamster. O subgênero *Viannia* compreende espécies do **complexo brasiliensis**, como por exemplo, *Leishmania (Viannia) guyanensis*, *L.*

(*Viannia*) *panamensis* e *L. (Viannia) brasiliensis*, responsáveis pela leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo. No subgênero *Leishmania* estão espécies do complexo **donovani** e do complexo **mexicana**. No **complexo donovani** as espécies são causadores de leishmaniose visceral no Velho (*L. (Leishmania) donovani*) e no Novo Mundo (*L. (Leishmania) chagasi*), e no **complexo mexicana** provocam leishmaniose cutânea e mucocutânea no Novo Mundo, por exemplo, *L. (Leishmania) mexicana* e *L. (Leishmania) amazonensis*. No Velho Mundo, a leishmaniose cutânea e mucocutânea são causadas por espécies que não se enquadram nos complexos citados, como *L. (Leishmania) major*, *L. (Leishmania) aethiopica* e *L. (Leishmania) tropica* (JARDIM, 2001).

Os sítios onde ocorrem o ciclo evolutivo e a transmissão em ciclo natural de *Leishmania* spp são basicamente nos flebotomíneos (dípteros fêmeas de *Lutzomia* sp no Novo Mundo e *Phlebotomus* sp no Velho Mundo) e nos hospedeiros vertebrados. O ciclo biológico da *Leishmania* spp inicia-se quando o inseto vetor alimenta-se de um hospedeiro infectado e captura formas amastigotas durante o repasto sanguíneo (BAILEY; LOCKWOOD, 2007). Quatro a cinco dias após o repasto em um hospedeiro infectado as formas amastigotas se transformam em promastigotas, multiplica-se por fissão binária, migram para as partes anteriores do tubo digestivo atingindo o aparelho picador sugador. Ao picar outro animal, ocorre inoculação das formas promastigotas, que são englobadas por macrófagos do hospedeiro. Nas células fagocitárias do hospedeiro vertebrado, os parasitos se transformam em formas amastigotas, que se multiplicam por fissão binárias dentro dos vacúolos parasitóforos, e sobrevivem neste ambiente devido a uma variedade de mecanismos de defesa. A célula infectada multiplica-se, dividindo seus parasitos entre as células filhas, ou se rompe liberando as amastigotas que são, então, fagocitadas por outros macrófagos e tornam a se multiplicar. Em outros repastos

sanguíneos, novos flebotomíneos ingerem macrófagos infectados. No tubo digestivo do inseto, as formas amastigotas transformam-se em promastigotas, multiplicam-se por fissão binária e o ciclo recomeça (Fig. 2) (MICHALICK, 2005).



**Figura 02** – Ciclo de vida de *Leishmania* spp. (1) Mosquito retira sangue do hospedeiro e injeta promastigotas. (2) Promastigotas são fagocitadas pelos macrófagos. (3) promastigotas se transformam em amastigotas no interior dos macrófagos. (4) Amastigotas são liberados e infectam outras células. (5) Mosquito ingere sangue infectado do homem. (6) Ingestão de células parasitadas. (7) Amastigotas se transformam em promastigotas no estômago do mosquito. (8) Promastigotas se multiplicam no estômago do mosquito transmissor. Adaptado de: [www.dpd.cdc.gov/.../body\\_Leishmaniasis\\_page1.htm](http://www.dpd.cdc.gov/.../body_Leishmaniasis_page1.htm)

A interação entre os parasitos e os hospedeiros intermediários e os hospedeiros definitivos se apresenta de forma diferenciada em cada um. Nos flebotomíneos durante o repasto sanguíneo provocam lesões na epiderme, formando um microambiente no qual as formas promastigotas encontram condições para infectar o mamífero (MICHALICK, 2005). A saliva do *flebótomo* contribui por meio de um peptídeo de 7 kDa vasodilatador conhecido como Maxadilan (MAX), com capacidade de imunomodulação, que desvia a resposta imune tipo Th1 para Th2 e favorece a evolução da doença, e assim promove um campo perfeito para a injeção do parasito em seu hospedeiro, com resposta inflamatória mínima (AIRES et al., 2005).

Já nos mamíferos, como o protozoário é um parasito intracelular, a forma promastigota precisa ser fagocitada. E o processo de instalação do parasito é muito complexo, dependendo da virulência da cepa e da resposta imune do hospedeiro. Muitas moléculas de superfície têm sido descritas na mediação da internalização do protozoário pelos macrófagos (KIMA et al., 2000). Uma variedade de molécula é importante para a relação dos parasitos com seu hospedeiro, determinando a virulência, infecciosidade, sobrevivência e patogenicidade (MICHALICK, 2005). O principal glicoconjugado de superfície em promastigotas de *Leishmania* é conhecido como lipofosfoglicana (LPG), sendo expresso em toda a sua superfície incluindo o flagelo. Outra importante molécula na interação com a célula é uma protease chamada de gp63, uma glicoprotease de 63 KDa (MOSSER; BRITTINGHAM, 1997).

A fagocitose pelos macrófagos apresenta dupla função para o parasito, fornecendo o ambiente propício para seu desenvolvimento ou sendo responsável pela sua destruição. Envolve basicamente dois fatores: a adesão e a internalização. Para ambos estão envolvidos receptores

presentes na célula do hospedeiro. Os principais são os receptores de complemento CR3 e CR1 (SWANSON; FERNADEZ-MOREIA, 2002).

O protozoário apresenta três caminhos de adesão. Ao entrar no organismo pode ativar diretamente a molécula do complemento C3 por ação da LPG ou da gp63, liberando a Fração C3b que interage com o receptor CR1 e é quebrada em C3bi, um ligante do receptor CR3 e uma forma inativa de ativação das outras moléculas do complemento, e esta associação fornece uma adesão estável para permitir fagocitose (MOSSER; BRITTINGHAM, 1997). Além disso, pode permitir fixação direta da proteína gp63 em CR3 ou das fosfoglicanas em sítios de ligação de lectina no CR1 ou CR3. E em todos ocorre impedimento da explosão respiratória e a opsonização por complemento, aumentando a sobrevivência do parasito no interior da célula (HANDMAM, 2000).

Após engolfamento pelos macrófagos há formação do vacúolo parasitóforo (interação do fagossoma e lisossoma), um ambiente ácido, rico em peptídeos microbicidas, enzimas hidrolíticas e Óxido Nítrico (NO) (COSTA et al., 2007). A produção de NO pela célula afeta uma variedade de funções celulares como a interação célula-célula, citotoxicidade, mecanismos de manutenção da homeostase e numerosos outros *papéis* fisiológicos (FERREIRA et al., 2008).

O óxido nítrico é produzido da L-arginina pela enzima óxido nítrico sintase (NOS) em duas reações de oxidação resultando em L-citrulina e NO (STUHER, 1999). A enzima (NOS) já foi purificada de uma variedade de tecidos de mamíferos, mas em poucos organismos unicelulares (TEMPORAL et al., 2005). PIACENZA e cols. (2001) demonstraram a utilização de L-arginina por *Trypanosoma cruzi* para a produção de poliaminas capazes de modular a apoptose do parasito via produção de NO. As formas promastigotas de *L. amazonensis* também apresentam a via da L-arginina na interação parasito-hospedeiro e formas promastigotas

infectivas (formas metacíclicas) de *Leishmania* produzem cerca de duas a três vezes mais NO que formas não infectivas. Formas amastigotas também produzem NO, e esse fato pode participar na regulação da resposta Th1/Th2 pelos macrófagos facilitando a sobrevivência do parasito no interior da célula (GENESTRA et al., 2006).

Para sobrevivência nesse novo meio a transformação para forma amastigota é obrigatória, perdendo flagelo e reduzindo drasticamente de tamanho (MAUEL, 1990). Assim o protozoário consegue alterar muitos dos mecanismos microbicidas, mas mantém o pH e o tráfico vesicular, precisando então desenvolver mecanismos para sua sobrevivência. As modificações incluem tornar a membrana mais resistente, função da proteína gp63 que inibe a ação do óxido nítrico. Além disso, essa membrana permite exploração do gradiente protônico para transporte de alimento e assim garantir sua nutrição. A enzima ATPase também é responsável por essa translocação de prótons em troca de alimentos. Para a sobrevivência também há a diminuição da respiração e do catabolismo de glicose e há formação da superóxido dismutase e catalase, que estimuladas por IFN- $\gamma$  e TNF- $\alpha$ , baixam a explosão respiratória (BALESTIERI et al., 2002). Essas modificações permitem que o protozoário se multiplique e sobreviva no interior da célula.

A resposta imune do hospedeiro vertebrado é determinante na evolução da infecção por *Leishmania*, que apesar de ser um parasito intracelular, tem seus antígenos apresentados preferencialmente através de moléculas do complexo de histocompatibilidade principal (MHC) de classe II, contrastando com a utilização do MHC de classe I pela maior parte dos organismos intracelulares, como os vírus e o *Trypanosoma cruzi* (LOCKSLEY; REINER, 1995). Este fato ressalta a importância de células T CD4+ na resposta imune contra este parasito, sendo comprovado por LOCKSLEY e cols.. (1993), os quais demonstraram que camundongos



deficientes em MHC de classe II eram incapazes de resistir à infecção por *Leishmania major*, apesar da presença de células T CD8+ normais.

Em contrapartida, WANG e cols. (1993), demonstraram que camundongos depletados para o gene da  $\beta$ 2-microglobulina que possuem células CD4+ normais, mas sem células CD8+, são capazes de curar-se do desafio com *Leishmania major*. As células T CD4+, ou linfócitos T “helper”, possuem um papel determinante na resposta imune, uma vez que são capazes de polarizar esta resposta para imunidade celular (resposta Th1) ou humoral (resposta Th2) pela liberação de diferente perfil de citocinas. A ativação dos macrófagos pelas citocinas derivadas de células T é muito importante no controle da infecção e progressão da doença, uma vez que nestas células a inibição do crescimento ou destruição do parasito é mediada pela produção de óxido nítrico, a partir da enzima óxido nítrico sintase induzível (iNOS), que é ativada principalmente pelo IFN- $\gamma$  (GRADONI, 2001).

Considerando a variabilidade antigênica de *Leishmania* spp e a relação parasito-hospedeiro envolvida no processo de infecção existem um pequeno numero de drogas capazes de interferir na viabilidade de Leishmanioses, entre elas estão anfotericina B e antimoniais pentavalentes, como o sodium stibogluconate (Pentostan®) e o N-metil-glucamine antimoniate (Glucantime®) (TAVARES et al., 2007). Entretanto o mecanismo de ação dos antimoniais pentavelentes ainda não esta claramente determinado (AMATO et al., 2008). E todas essas drogas apresentam uso limitado devido à alta toxicidade, carência de eficácia em áreas endêmicas (devido a crescente resistência do parasito as drogas) e dificuldade de administração devido ao longo período de tratamento e seus altos custos (DAVIES et al., 2003). Assim a quimioterapia para controle das Leishmanioses é limitada e ainda não existem vacinas efetivas no combate ao parasito (PALATNIK-DE-SOUSA, 2008).

Inúmeras drogas alternativas estão sendo testadas na viabilidade do parasito tanto in vitro como in vivo. NAULA e cols., em 2005, revisaram o uso das proteínas kinases como alvo no tratamento de Leishmanioses e tripanossomíase africana. RODRIGUES e cols., em 2006, verificaram o efeito do imidocarb e levamisole em infecções experimentais em camundongos BALB/c por *Leishmania (L.) amazonensis*, mostrando esses como potenciais drogas no tratamento da leishmaniose tegumentar. E a pesquisa de drogas consideradas naturais esta em ascensão, com estudos sobre plantas, algas marinhas e abelhas com atividade leishmanicida (BRAGA et al., 2007; FREILE-PELEGRIN et al., 2008; AYRES et al., 2007).

Outro tipo de estudo envolve as peçonhas de serpentes como possíveis drogas que alteram a viabilidade de protozoários. Em 2005, DEOLINDO e cols. observaram a indução de morte celular em *Trypanosoma cruzi* por peçonha de *Bothrops jararaca*, através de indução de estress nas formas epimastigotas. TEMPONE e cols., em 2001, mostraram a indução da morte celular, in vitro, nas formas promastigotas de espécies de *Leishmania* spp pela ação da peçonha da serpente *Bothrops moojeni*, provavelmente pela carência de catalases e peroxidases que provocam, já que estes servem como mecanismo de defesa do parasito. Para entender esses efeitos é preciso conhecer a composição das peçonhas de serpentes.

## 4.2 Peçonhas

As serpentes são animais vertebrados e pertencentes ao grupo dos répteis. Elas subdividem-se em peçonhentas e não peçonhentas (PINHO; PEREIRA, 2001). Existem no mundo aproximadamente 3000 espécies de serpentes, das quais 10% a 14% são consideradas peçonhentas. A Organização Mundial de Saúde (OMS) calcula que ocorram em nível mundial aproximadamente 2.500.000 acidentes por serpentes peçonhentas por ano, com 125.000 mortes. Já no Brasil, ocorrem por ano, entre 19.000 a 22.000 acidentes ofídicos com aproximadamente 115 óbitos (PINHO et al., 2004).

No Brasil, as espécies de serpentes peçonhentas pertencem aos gêneros *Bothrops* (jararacas), *Lachesis* (surucucus), *Crotalus* (cascavéis) e *Micrurus* (corais). Sendo que o primeiro é responsável por cerca de 90% dos acidentes (CARDOSO et al., 1993).

As serpentes do gênero *Bothrops* compreendem cerca de 30 espécies, distribuídas por todo o território nacional. As espécies mais conhecidas são: *B. atrox* (jararaca ou caiçaca), encontradas no norte do Brasil; *B. erythromelas*, encontradas na região nordeste; *B. neuwiedi* (jararaca pintada ou boca de sapo), encontradas em todo território nacional, exceto região norte do país; *B. jararaca* (jararaca), distribuídas na região sul e sudeste; *B. jararacussu* (jararacuçu) encontradas no cerrado da região central e em florestas tropicais do sudeste e *B. alternatus* (urutu), distribuídas ao sul do país (PINHO; PEREIRA, 2001) e *B. moojeni* (caiçaca) frequentes na região Central e Sudeste do Brasil, no domínio morfoclimático do Cerrado (BORGES; ARAUJO, 1998). Habitam zonas rurais e periferias de grandes cidades, preferindo ambientes úmidos como matas e áreas cultivadas e locais onde haja facilidade para proliferação de roedores

(paióis, celeiros, depósitos de lenha). Tem hábitos predominantemente noturnos ou crepusculares (PINHO; PEREIRA, 2001).

As peçonhas de serpentes são um complexo de agentes tóxicos e não tóxicos que possuem efeitos fisiológicos no sistema cardiovascular, na permeabilidade vascular, na função renal e na hemostase (ESTÊVÃO-COSTA et al., 2000). Elas podem apresentar variações na composição, diferenciando-se entre as famílias, gêneros e espécies ou mesmo dentro de uma mesma espécie. Diferenças intra-específicas na composição do veneno são decorrentes de variações geográficas, sexuais, ontogenéticas e sazonais (ROCHA; FURTADO, 2005). Proteínas e peptídeos são os principais componentes das peçonhas, constituindo de 90 a 95% de seu peso seco. Além destes, há uma porção não protéica representada por íons metálicos, carboidratos, nucleosídeos, aminas e uma baixa proporção de lipídeos e aminoácidos livres (MARKLAND, 1998).

As peçonhas de serpentes botrópicas apresentam grande atividade proteolítica, característica responsável pelos principais efeitos sistêmicos observados após o acidente ofídico (BERNARDES et al., 2008). A larga variedade de proteases presentes afetam diferentes etapas da cascata de coagulação sanguínea, podendo induzir incoagulabilidade sanguínea por consumo de fibrinogênio, responsável pela coagulação do sangue (ESTEVAO-COSTA et al., 2000). Também possui importantes atividades fisiopatológicas, com lesões locais e destruição tecidual (também devido a ação proteolítica), promove liberação de substâncias hipotensoras e provoca lesões na membrana basal dos capilares por ação das hemorraginas (ação hemorrágica), que associada à plaquetopenia e alterações da coagulação, promovem as manifestações hemorrágicas frequentes após acidente ofídico por serpentes botrópicas (PINHO; PEREIRA, 2001).

Assim os efeitos locais e sistêmicos causados pela inoculação da peçonha da serpente se manifestam devido a ação dessas proteases presentes. Os efeitos locais são equimoses, isquemia, necrose e eventualmente gangrena. As manifestações sistêmicas mais comuns são a indução do estado de choque, distúrbios na coagulação sanguínea, alterações cardiovasculares, hemorragias gastrintestinais, náuseas, vômitos e hematúria (BARRAVIERA, 1999).

Essas proteases são um grupo heterogêneo de proteínas com uma larga escala de massas moleculares entre 15 e 380 kDa (KINI; EVANS, 1992). Muitas são proteínas de cadeia única (GAO et al., 1998) e outras são proteínas com multi-subunidades (FRY, 1999). As proteases documentadas até o momento podem ser classificadas de acordo com suas interações com inibidores, em dois grupos: metalo e serinoproteases.

As metaloproteases são enzimas dependentes de íons metálicos para exercer sua função biológica e tem ação sobre o fibrinogênio do sangue impedindo a coagulação sanguínea (BERNARDES et al., 2008) . Elas são secretadas em uma forma latente e possuem um mol de zinco por molécula, requerendo ativação para desenvolver atividade proteolítica (MATRISIAN, 1990). A remoção do zinco por agentes quelantes como o EDTA e 1,10 fenantrolina podem inibi-las, eliminando completamente sua atividade (BJARNASON, FOX, 1988/89).

As serinoproteases são caracterizadas principalmente como enzimas com atividade tipo trombina (KAMIGUTI, SANO-MARTINS, 1995). Tais enzimas possuem um resíduo de serina altamente reativo, o qual exerce um papel crítico na catálise. Inibidores dessas proteases como diisopropilfluorofosfato (DFP) e o fenilmetilsulfonil fluoreto (PMSF) reagem com a serina do sítio ativo, inativando irreversivelmente essas proteases. Estas proteases são análogas aos fatores endógenos da coagulação e ativam a cascata sanguínea em etapas específicas (BERNARDES et al., 2008).

As proteases em conjunto com outras classes de proteínas, conhecidas como fosfolipases e miotoxinas, são responsáveis pela complexa lesão causada por peçonhas botrópicas que se deve à somatória dos efeitos isolados dos diferentes componentes, com ações biológicas distintas ou com ação sinérgica (BERNARDES et al., 2008).

As fosfolipases A2 (PLA2) são enzimas miotóxicas nas membranas plasmáticas das células musculares (STABELI et al., 2006) extensamente distribuídas na natureza e de alto interesse médico-científico devido ao seu envolvimento em várias doenças inflamatórias humanas e no envenenamento por peçonhas de serpentes e abelhas (NEVALAINEN et al.; 2004). Supõe-se que as miotoxinas agem no sarcoplasma, desorganizando os fosfolípidos e o influxo de íons  $\text{Ca}^{2+}$  (RODRIGUES et al., 1998). Estas enzimas são encontradas tanto no interior quanto no exterior das células. As PLA2s extracelulares são abundantes em tecidos pancreáticos e nas peçonhas de serpentes e artrópodes (SOARES, 1997).

As secreções tóxicas liberadas pelas serpentes também ocultam compostos protéicos e enzimas que atuam no tratamento e prevenção de desordens trombóticas (OLIVEIRA, 2001), no efeito da pressão arterial, na contenção de crescimento de células malignas e até mesmo como potente analgésico. Além disso, trabalhos recentes vem demonstrando a ação dessas peçonhas na viabilidade de varios parasitos, incluindo *Leishmania* (STABELI et al., 2006; DEOLINDO et al., 2005; GONÇALVES et al., 2002; TEMPONE et al., 2001).

Na região do Triangulo Mineiro a serpente *Bothrops moojeni* é a principal causadora dos acidentes ofídicos confirmados e registrados pelo Hospital das Clinicas de Uberlândia (BRITES; BAUAB, 1988) e a grande presença de proteases em sua peçonha desperta interesse na comunidade científica. Nos dias atuais, as eficientes técnicas de purificação e caracterização

protéica têm permitido o isolamento de proteínas (BERNARDES et al., 2008; STABELI et al., 2006) e a obtenção de proteínas constituintes da peçonha de serpentes ofídicas.

Assim a peçonha de serpente *Bothrops moojeni* apresenta importante atividade fisiopatológica, com lesões locais e destruição tecidual (ação miotóxica) (BERNARDES et al., 2008). Ativa a cascata de coagulação sanguínea podendo induzir a incoagulabilidade por consumo de fibrinogênio (ação coagulante) e pode promover a liberação de substâncias hipotensoras, provoca lesões na membrana basal dos capilares por ação das hemorraginas (ação hemorrágica) (PINHO; PEREIRA, 2001). E, além disso, é capaz de desencadear uma rede de ativação ou inibição de citocinas, alterando a resposta imune do organismo afetado (COSTA et al., 2001). Como a infecção por *Leishmania* spp apresenta grande resposta inflamatória no hospedeiro é de grande interesse a pesquisa sobre o efeito das proteínas presentes na peçonha de *Bothrops moojeni* nesse parasito.

## 5 Objetivos

### 5.1 Geral

Objetivou-se avaliar a ação da peçonha da serpente *Bothrops moojeni* sobre a viabilidade e o crescimento de protozoários do gênero *Leishmania* spp.

### 5.2 Específicos

- Cromatografar a peçonha da serpente *Bothrops moojeni*;
- Avaliar a atividade das Frações protéicas dessa peçonha sobre a viabilidade do parasito;
- Avaliar o efeito ‘*in vitro*’ dessa peçonha e de suas Frações sobre a produção de óxido nítrico pelo parasito;
- Avaliar o efeito das proteínas presentes na peçonha sobre as proteínas de *Leishmania* spp;
- Avaliar também o efeito ‘*in vivo*’ da peçonha e suas Frações sobre o crescimento da lesão em camundongos BALB/c provocadas por *Leishmania* spp;
- Realizar uma caracterização das frações protéicas, que apresentaram efeito sobre os parasitos, quanto ao perfil eletroforético.



## 6 Materiais e Métodos

### 6.1 Obtenção das peçonhas

A peçonha da serpente *Bothrops moojeni* foi adquirida do Serpentário Bioagents, Batatais-SP, sob responsabilidade da bióloga Alexandra Jardim Sandrin. Após a coleta, a peçonha foi imediatamente dessecada a vácuo em temperatura ambiente e conservada à -20°C até o momento do uso.

### 6.2 Fracionamento da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* e Frações

#### 6.2.1 Cromatografia de troca iônica da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* em gel de DEAE (-) Sephacel

O fracionamento da peçonha bruta de *B. moojeni* seguiu técnicas descritas por OLIVEIRA (2001). Cerca de 200 mg da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* foram dissolvidos em 2,0 mL de tampão bicarbonato de amônio (AMBIC) 0,05 M pH 7,8, centrifugados a 10.000g por 10 min em temperatura ambiente e aplicados a uma coluna de DEAE (-) Sephacel (Sigma Chemical Co) (1,5 X 15 cm). As amostras foram eluídas com um gradiente convexo de concentração de bicarbonato de amônio (0,05 – 0,3 M) pH 7,8, utilizando uma câmara de mistura com um volume de 150 mL. As Frações, contendo 3,0 mL cada, foram coletadas num fluxo de 20 mL/hora, por um coletor de Frações Bio Rad. A absorbância de cada Fração foi acompanhada

em 280 nm, num espectrofotômetro ULTROSPEC 1000E (Pharmacia Biotech). Em seguida um gráfico foi construído, sendo as amostras delimitadas, reunidas em “pools”, dosadas, liofilizadas e armazenadas a - 20 °C até o momento de uso.

### **6.2.2 Cromatografia de exclusão molecular em Sephadex G-75 das Frações obtidas**

As principais Frações obtidas na cromatografia de troca iônica, e que, apresentaram melhores efeitos sobre o parasito, foram reunidas em um “pool”, liofilizadas, ressuspensas em 3 mL de tampão AMBIC 0,05 M, pH 7,8, e aplicadas a uma coluna de Sephadex G-75 (Sigma Chemical Co) (1,0 X 100 cm), equilibrada com o mesmo tampão (AMBIC 0,05 M). As Frações foram coletadas, monitorizadas e reunidas conforme descrito no item anterior.

### **6.3 Determinação quantitativa de proteínas**

As dosagens protéicas em soluções contendo de 0,1 a 2,0 mg de proteína seguiram o método do microbiureto, conforme descrito por ITZHAKI e GILL (1964). A reta padrão foi construída utilizando-se soroalbumina bovina.

### **6.4 Eletroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes para a**

## **determinação do peso molecular**

A determinação da massa aparente das amostras foi realizada por eletroforese em gel de poliacrilamida a 14%, com agentes desnaturantes, conforme a técnica descrita por LAEMMLI (1970). Foi utilizado um gel de empilhamento a 5% em pH 6,8 contendo 0,125M de Tris-HCl e 0,1% de SDS e um gel de separação a 14% em pH 8,8 e 0,1% de SDS, mantendo a relação acrilamida:bis-acrilamida de 30:0,8 (m/m).

O padrão de massa molecular utilizado foi fosfolirase b (97 kDa), albumina soro bovina (66 kDa), albumina (45 kDa), anidrase carbônica (30 kDa), inibidor de tripsina (20.1 kDa) e  $\alpha$ -lactoalbumina (14.4 kDa). Os géis foram corados em Coomassie brilhante blue R-250 e ou Nitrato de Prata. A massa relativa das proteínas foi estimada pelo software Kodak 1D image analysis.

## **6.5 Parasitos**

Os parasitos foram obtidos por meio de cultivo axênico de promastigotas de *Leishmania (Leshmania) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), doadas do Centro de Controle de Zoonoses do município de São Paulo, São Paulo, Brasil, e *Leishmania (Viania) braziliensis* (MHOM/BR/75/M2903), doadas do Centro de Doenças Infecciosas da Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, Brasil, em meio BHI (Brain Heart Infusion, Oxoid LTD, Basingstoke, Hampshire, UK) suplementado com 10% de soro bovino fetal (Cultilab, Campinas, BR), 1% de

antibiótico e 1% de L-glutamina (Gibco BRL-Life Technologies, New York, USA) a 25°C até atingirem a fase estacionária.

A alta virulência das cepas foi obtida pela inoculação das mesmas em camundongos BALB/c. Foram avaliados os parâmetros: formação de lesões cutâneas e tempo de evolução das lesões.

### **6.6 Tratamento das formas promastigotas de *Leishmania* com peçonha *Bothrops moojeni* e suas Frações**

*Leishmania* promastigotas foram cultivados em placa de 96 poços ( $2 \times 10^5$  parasitos/poço) e incubados a 25° C por 72 horas com diferentes concentrações de peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (25, 12.5, 3.125, 1.56 µg) ou suas Frações protéicas obtidas por cromatografia (2.5, 1.25, 0.625, 0.3125 µg) ou anfotericina B (25, 12.5, 6.25, 3.125, 1.56 µg), controle positivo, em triplicata. A viabilidade dos parasitos foi analisada por teste MTT. Depois as placas foram centrifugadas e o sobrenadante foi coletado para determinação da produção de Óxido Nítrico pelos parasitos. As amostras de parasitos tratados também foram utilizadas para análise do efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* no perfil protéico de *Leishmania* spp. Depois de centrifugação, o *sedimento* foi tratado com dodecil sulfato de sódio (SDS) e 2-mercaptoetanol e aquecido a 100 °C por três minutos e então corridas em gel de Poliacrilamida a 14%.

### 6.7 Determinação da viabilidade celular pelo método do MTT

A viabilidade celular de *Leishmania* spp foi determinada pelo método do MTT (3-(4,5-Dimetil-2-Tiazolil)-2,5-Difenil-2H-Tetrazolium-Bromidico) de acordo com MOSMANN, 1983. Após o cultivo dos parasitos em placa de 96 poços, a mesma foi centrifugada a 2.000 x g por 15 minutos a temperatura ambiente, sobrenadante foi coletado para dosagem de Óxido Nítrico produzido pelos parasitos, e foram adicionados 100 µL de meio BHI completo e fresco e em seguida 10 µL de solução de MTT a 5 mg/mL e a reação ocorreu durante 4 horas. Em seguida, a reação do MTT foi interrompida com 100 µL de isopropanol-ácido (2,5 mM ácido clorídrico em Isopropanol) e incubada por 10 minutos. A leitura foi feita a 540 nm em leitor de placas (Molecular Devices, USA) a 570 nm (ABS). Todos os ensaios foram realizados em triplicata. A taxa de viabilidade foi calculada pela seguinte equação:

$$\% \text{ viabilidade} = \frac{\text{ABS teste}}{\text{ABS controle}} \times 100 - 100$$

### 6.8 Dosagem de Óxido Nítrico pelo Método de Griess

A produção de óxido nítrico (NO) foi analisada pelo método de Griess descrito por GREEN e cols. (1982). Para dosagem de NO foi utilizada uma curva padrão com N<sub>2</sub>NO<sub>3</sub> (peso molecular 69) e a curva iniciada com 200 µM ate a 11° diluição na razão 2, em água destilada. As amostras (sobrenadante de cultura de parasitos) foram utilizadas puras. O reagente de Griess foi preparado adicionando-se em uma solução a 2,5% de H<sub>3</sub>PO<sub>4</sub> Sulfanildamida (para a

concentração de 1%) e  $\alpha$ -Naftiletilenoaminohidrocloro (NEED) (para concentração de 0,1%). A reação foi realizada adicionando-se 100  $\mu$ L de cada diluição da curva em placas de 96 poços e também as amostras de sobrenadante de cultura de parasitos. Em seguida, foram misturadas na proporção de 1:1, NEED e Sulfanilamida (reagente de Griess) e adicionados 100  $\mu$ L nos poços contendo a curva e as amostras. A reação foi lida em leitor de microplacas à 540 nm (Molecular Devices, USA). Como controle da reação foi utilizado 100  $\mu$ L de água adicionado de 100  $\mu$ L do reagente de Griess. Todas as reações foram feitas em triplicatas.

## **6.9 Animais**

Foram utilizados camundongos isogênicos da linhagem BALB/c, fêmeas de 6 a 8 semanas, mantidos no Biotério do Laboratório de Experimentação Animal da Universidade Federal de Uberlândia (LEA-UFU).

## **6.10 Infecção experimental em camundongos**

Formas promastigotas metacíclicas de *Leishmania (L.) amazonensis* (IFLA/BR/67/PH8), na fase estacionária mantidos em cultura sem tratamento, tratadas com 25  $\mu$ g de peçonha de *Bothrops moojeni* ou com 5  $\mu$ g da Fração E5 foram colhidas, centrifugadas por 10 minutos a 1000 x g, e ressuspensas em salina tamponada com fosfatos (PBS a 0,15 M, pH 7,2). A contagem dos parasitos foi realizada em câmara de NEUBAUER e ajustada para a concentração de  $2 \times 10^6$

parasitos em 50  $\mu$ L de PBS. O inóculo foi realizado por via subcutânea no coxim plantar de camundongos BALB/c. Em todos os tratamentos foram utilizados animais em triplicata.

### **6.11 Evolução da lesão**

A evolução da lesão nos animais infectados e no grupo controle (somente tampão PBS) foi avaliada semanalmente, por um período de 10 semanas, pela medida do tamanho da lesão da pata infectada em relação à medida da pata contra lateral não infectada, utilizando-se de um especímetro manual (Mitutoyo). Os resultados foram expressos como média +/- e desvio padrão das diferenças do tamanho da pata infectada e a contra lateral não infectada.

### **6.12 Análises Estatística**

Comparações estatísticas foram realizadas por análises das variâncias (one-way-ANOVA) e as diferenças estatísticas dos dados foram analisadas por teste de comparação múltipla de Tukey (Statistics Package for Social Sciences, version 10.0). As diferenças foram consideradas significativas quando  $p < 0.05$ .

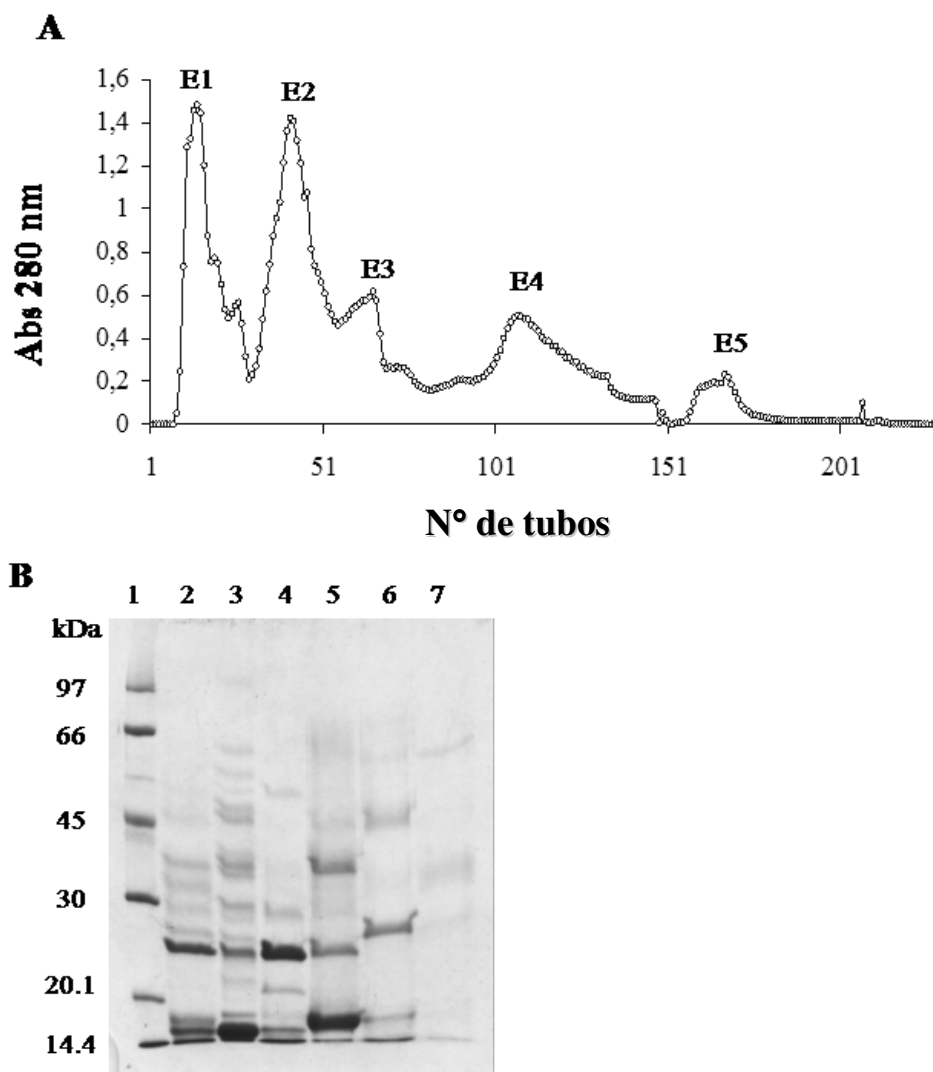
## 7 Resultados

### 7.1 Fracionamento da peçonha de *Bothrops moojeni* e suas Frações protéicas.

#### 7.1.1 Cromatografia de Troca Iônica (DEAE (-) Sephacel) e SDS-PAGE das Frações protéicas obtidas

Peçonha de *B. moojeni* foi fracionada em cinco Frações protéicas através da cromatografia de troca iônica em coluna DEAE (-) Sephacel, que foram denominadas de Fração E1, E2, E3, E4 e E5 (Fig. 3A). Depois da cromatografia foi feito um gel de SDS PAGE a 14% com agentes desnaturantes com as mesmas concentrações de cada Fração (Fig. 3B), E1 mostrou conter proteínas bem evidentes com peso molecular estimado em 14 kDa, 15 e 24 kDa (Fig 3B). A Fração E2 apresenta fortes bandas coradas com peso molecular correspondente a 15 e 24 kDa. Três principais bandas são observadas na Fração E3, com aproximadamente 36, 25, 15 kDa. A Fração E4 mostrou bandas pouco coradas e com 15, 27 e 46 kDa. As proteínas presentes na Fração E5 não apresentam forte marcação, mas as proteínas de 15 e 35 kDa são claramente visíveis (Fig. 3B).

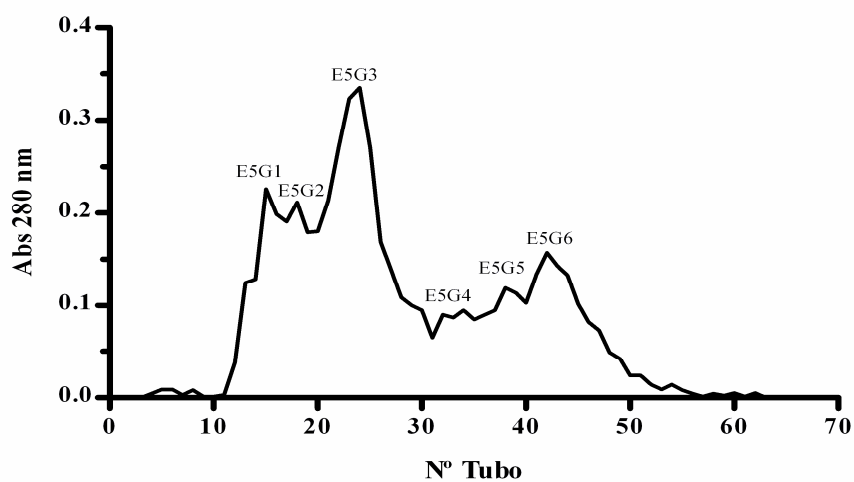




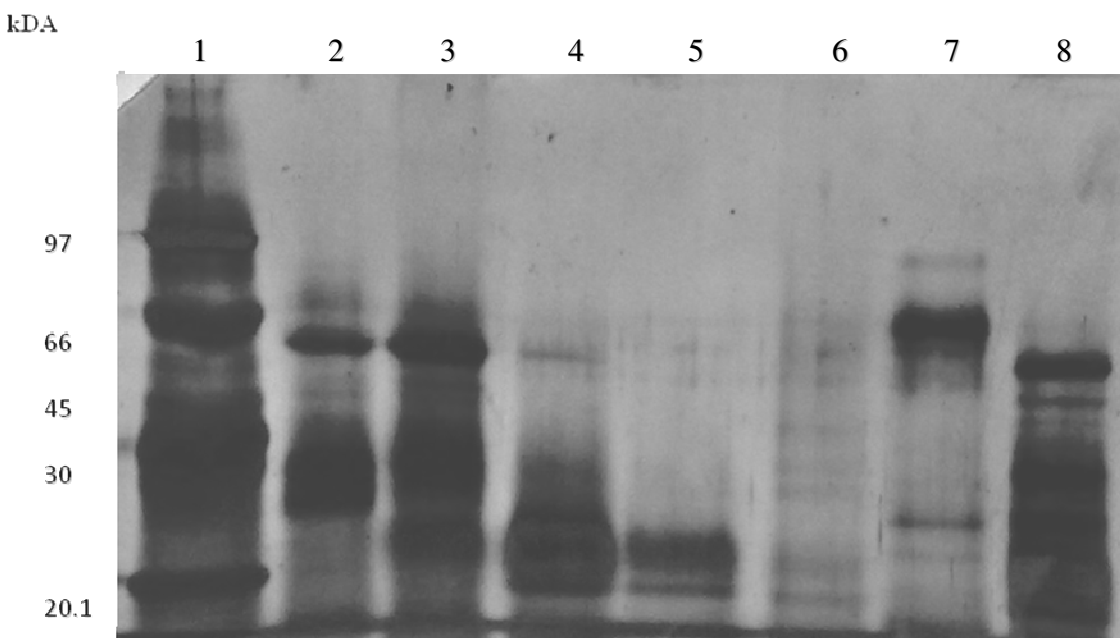
**Figura 3** – Proteínas da peçonha de *Bothrops moojeni* e Frações protéicas obtidas por Cromatografia de Troca Iônica. (A) Peçonha de *B. moojeni* foi fracionada em cinco Frações protéicas através de cromatografia de troca iônica em coluna DEAE (-) Sephacel e foram denominadas de Fração E1, E2, E3, E4 e E5; (B) Gel SDS-PAGE (14%) em condições desnaturantes das Frações protéicas obtidas da cromatografia de DEAE (-) Sephacel. Linha 1 – padrão de peso molecular; Linha 2 – peçonha de *Bothrops moojeni*; Linha 3 – Fração E1; Linha 4 – Fração E2; Linha 5 – Fração E3; Linha 6 – Fração E4; Linha 7 – Fração E5. O gel foi corado com coomassie brilhante blue R-250.

## **7.2 Cromatografia de Exclusão Molecular (Sephadex G-75) e SDS-PAGE das subFrações protéicas da Fração E5**

Após os estudos realizados com as Frações obtidas após cromatografia de troca iônica, os resultados com a Fração E5 nos levaram a realizar uma nova cromatografia, agora de exclusão molecular em resina Sephadex G-75. A Fração E5 foi reunida em “pool” protéico e eluída com tampão AMBIC em coluna de exclusão molecular, permitindo que as proteínas de maior peso molecular sejam coletadas primeiro e as com menores pesos são coletadas por último. Foram obtidos seis novos picos de Frações protéicas, chamados de E5G1, E5G2, E5G3, E5G4, E5G5 e E5G6 (Fig. 4). Após a cromatografia foi realizado um gel de SDS PAGE a 14% com agentes desnaturantes com as mesmas concentrações de cada subFração da Fração E5 (Fig. 5),



**Figura 4** – Cromatografia de Exclusão Molecular das SubFrações proteicas da peçonha de *Bothrops moojeni*. A Fração proteica E5, obtida após a peçonha de *Bothrops moojeni* ser eluída em cromatografia de coluna DEAE (-) Sephacel, foi fracionada em seis Frações proteicas através de cromatografia Sephadex G-75 (E5G1, E5G2, E5G3, E5G4, E5G5, E5G6)

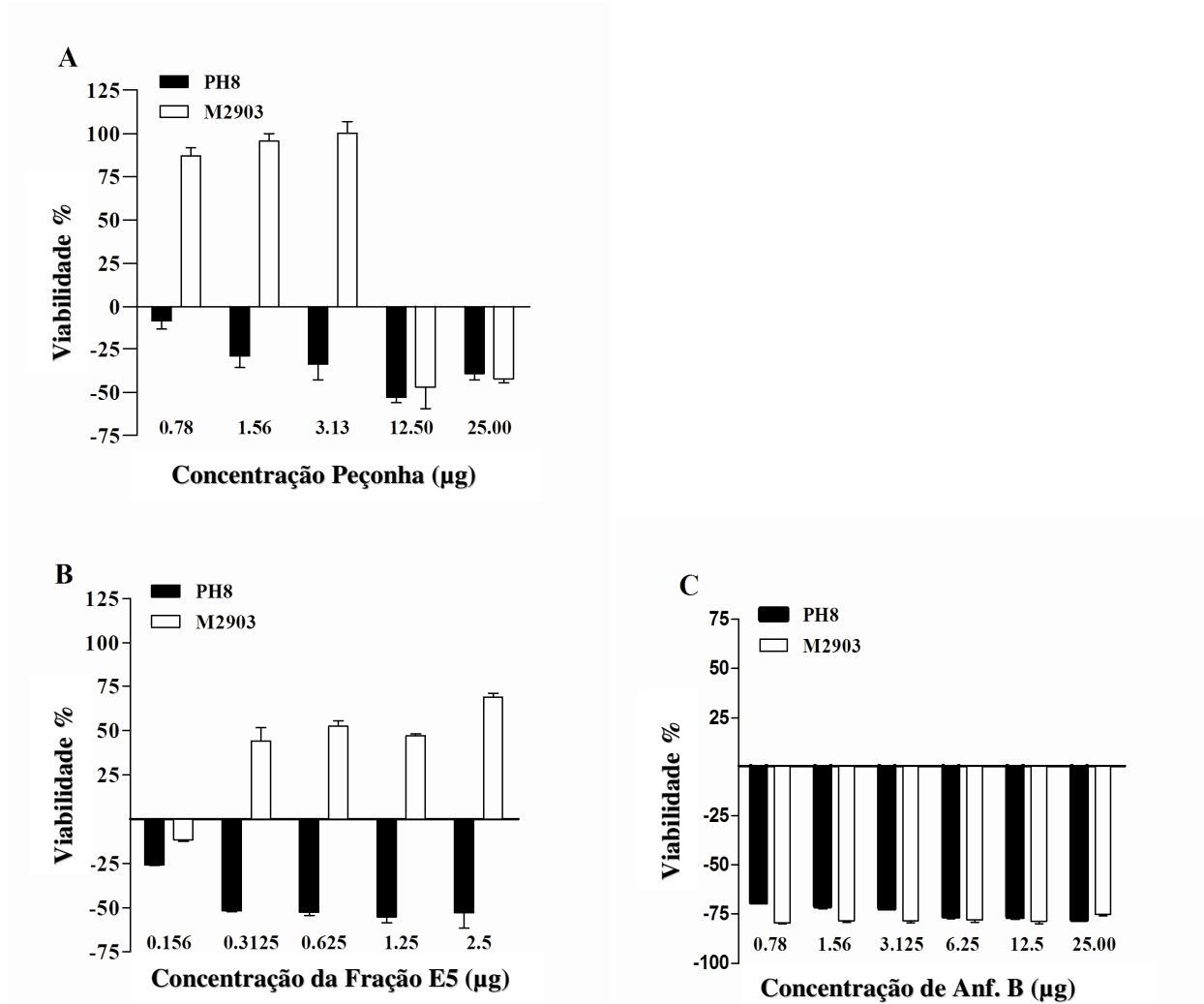


**Figura 5** - Eletroforese em Poliacrilamida a 14% em condições desnaturantes das subfrações da fração E5. Linha 1 – padrão de peso molecular; Linha 2 – Subfração E5G1; Linha 3 – Subfração E5G2; Linha 4 – Subfração E5G3; Linha 5 – Subfração E5G4; Linha 6 – Subfração E5G5; Linha 7 – Subfração E5G6; Linha 8 – Fração E5. O gel foi corado com Nitrato de Prata.

### 7.3 Análise do efeito da peçonha de *B. moojeni* e suas Frações protéicas em *Leishmania*

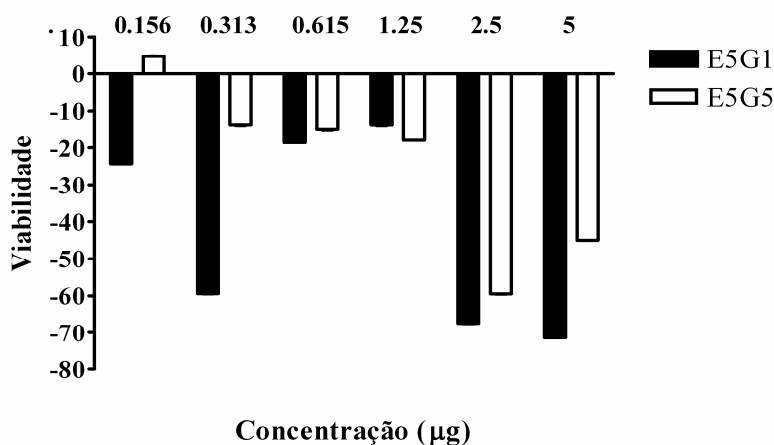
A peçonha de *B. moojeni* e suas Frações protéicas foram utilizadas para análise sobre a viabilidade de *Leishmania* através da degradação de MTT pelas células vivas, e a peçonha bruta e a Fração E5 demonstraram atividade sobre a viabilidade dos parasitos atingindo uma taxa de 50% de morte, enquanto as outras Frações (E1, E2, E3 e E4) mostraram alterações irregulares na viabilidade celular. Foi observado que tanto a peçonha bruta quanto a Fração E5 apresentam atividade inibitória dose dependente, apresentando maior taxa de morte de acordo com o

aumento da dose no tratamento (Fig. 6). *L. (L.) amazonensis* demonstrou maior sensibilidade ao tratamento, tanto para a peçonha bruta ( $\geq 0.78 \mu\text{g}$ ) quanto para a Fração E5 ( $\geq 0.156 \mu\text{g}$ ) (Fig. 6A e 6B). *L. (V.) braziliensis* foi sensível ao tratamento somente em altas concentrações da peçonha bruta de *Bothrops moojeni* (25 e 12.5  $\mu\text{g}$ ) e quando a concentração da Fração E5 era baixa (0.156  $\mu\text{g}$ ), havendo aumento na viabilidade em altas concentrações deste tratamento (Fig. 6A e 6B). Durante o tratamento com anfotericina B ambas as cepas apresentaram-se sensíveis em todas as concentrações analisadas (Fig. 6C) e análises estatísticas entre a anfotericina e peçonha e suas Frações mostraram que eles agem significativamente diferente um do outro, com  $p < 0.001$ , e somente a comparação entre peçonha e a Fração E5 não mostrou diferenças estatísticas entre eles. Entretanto todos os tratamentos apresentaram-se distintos devido à forma de atuação de cada um na viabilidade celular.



**Figura 6** – Viabilidade de *Leishmania amazonensis* (PH8) e *Leishmania brasiliensis* (M2903) utilizando o teste MTT. Parasitos ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram incubados por 72 horas com peçonha bruta (A), Fração E5 (B) ou anfotericina B (C), em diferentes concentrações, e então tratadas com MTT a 5 mg/ml. Foi observado que a peçonha inibe a viabilidade de ambas as cepas de parasitos de forma dose dependentes, enquanto a Fração E5 inibe somente a cepa de *L. amazonensis*.

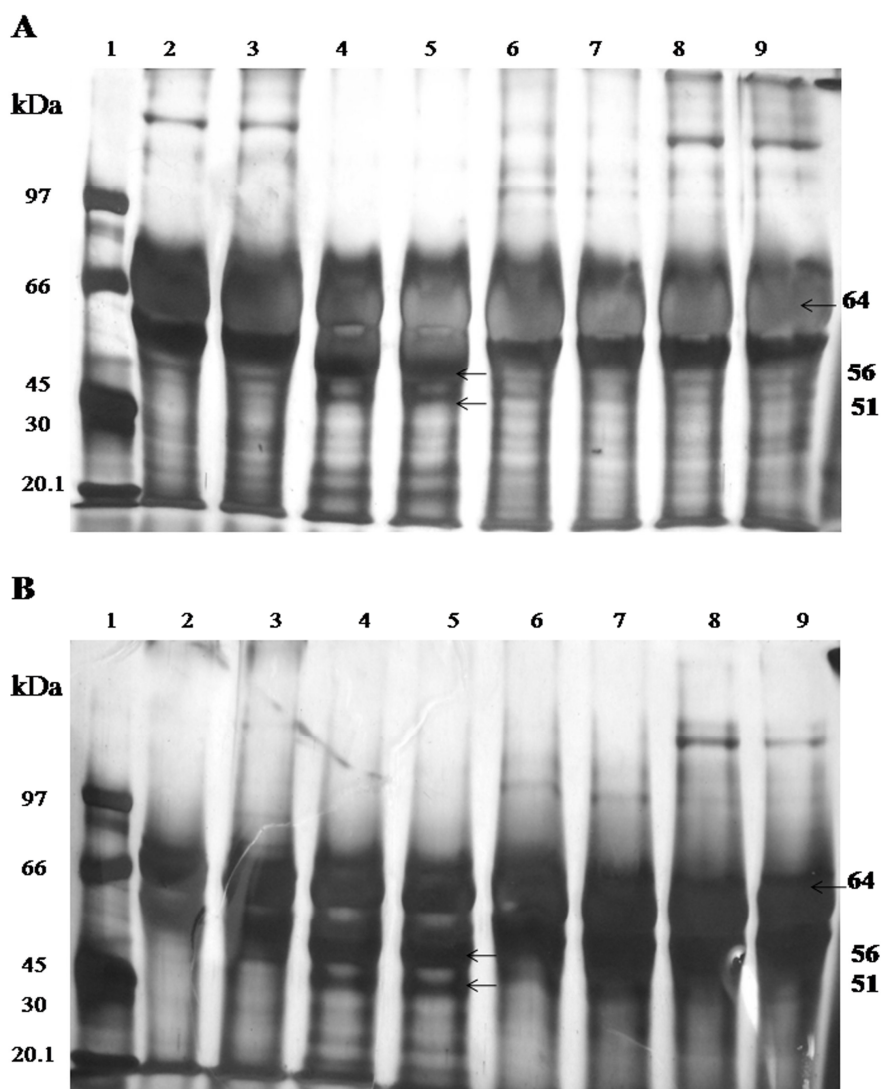
A Fração E5 foi reunida em pool protéico e eluída em cromatografia de exclusão molecular, em resina Sephadex G-75, e assim seis novos picos foram obtidos que foram testadas na viabilidade celular de *Leishmania (L.) amazonensis* e o parasito somente foi sensível as subFrações E5G1 ( $\geq 0.156 \mu\text{g}$ ) e E5G5 ( $\geq 0.313 \mu\text{g}$ ). A viabilidade dos parasitos foi diminuída de forma dose dependente (Fig 7). Nessas subFrações estão, provavelmente, as proteínas responsáveis pelos efeitos observados após tratamento com a Fração E5.



**Figura 7** - Viabilidade de *Leishmania (L.) amazonensis* utilizando o teste MTT. Parasitos ( $5 \times 10^5$  células/poço) foram incubados por 72 horas com as subFrações E5G1 e E5G5 da Fração E5 da peçonha de *Bothrops moojeni*, em diferentes concentrações, e então tratadas com MTT a 5 mg/ml.

Em adição, as proteínas de *Leishmania* spp tratadas com peçonha, Fração E5 e anfotericina B foram analisadas em SDS-PAGE a 14%. Foi observado interessante perfil eletroforético das proteínas de *L (L.) amazonensis* depois do tratamento com a peçonha bruta de *B. moojeni* quando comparado com parasitos não tratados. A proteína com peso molecular de aproximadamente 64 kDa sofreu aparentemente processo de degradação resultando em duas outras proteínas de 56 ou 51 kDa respectivamente (Fig 8). Entretanto quando o tratamento dos

parasitos foi feito utilizando a Fração E5 ou a anfotericina B não foi observado mudança no perfil protéico por eletroforese (Fig. 8).

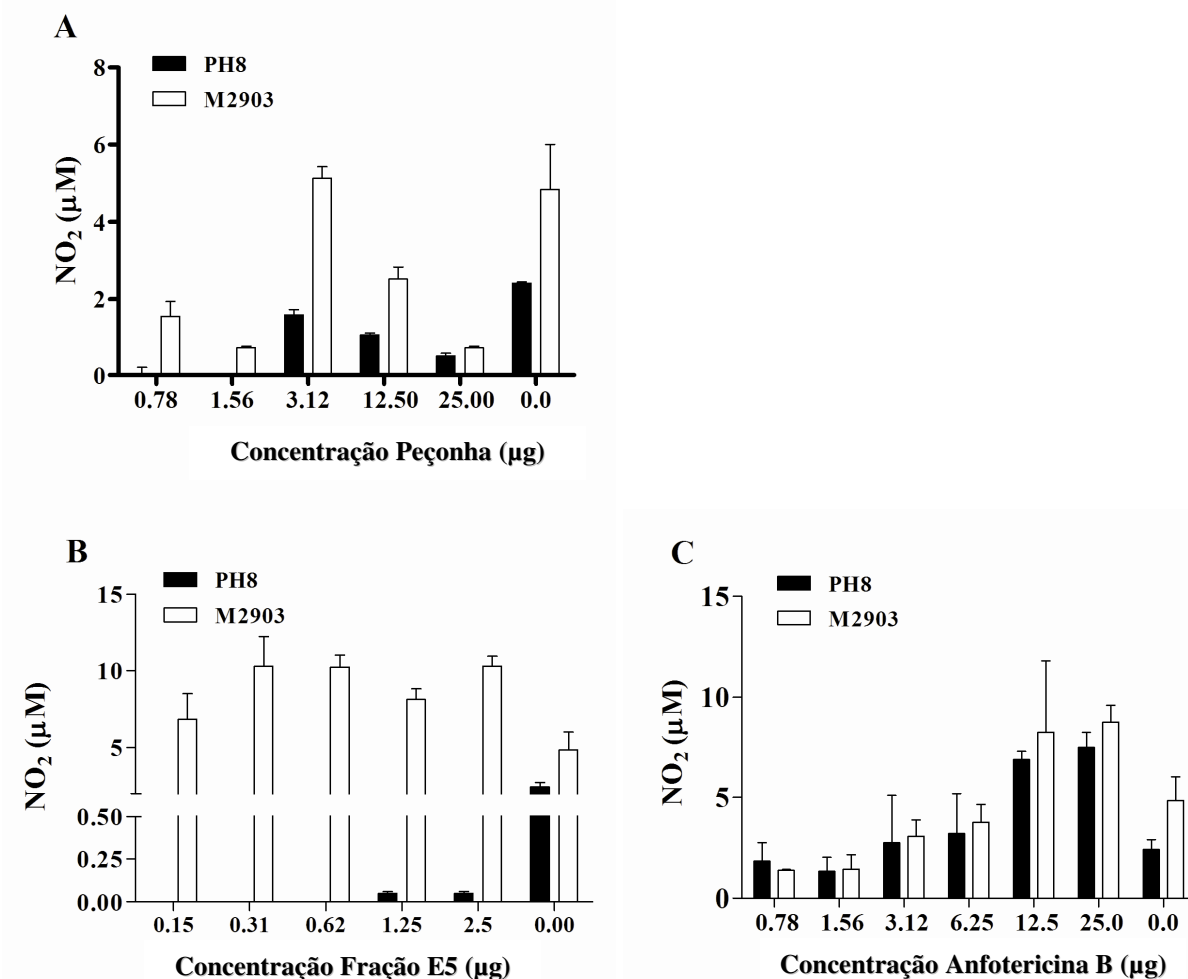


**Figura 8** – Perfil protéico de *L.(L.) amazonensis* (A) e *L.(V.) brasiliensis* (B) por gel SDS–PAGE (14%) em condições desnaturantes depois do tratamento. A proteína de 64 kDa de *Leishmania* spp é, aparentemente, degradada em outras duas proteínas de 56 e 51 kDa respectivamente. Linha 1 – padrão de peso molecular; Linha 2 e 3 – *Leshmania* sem tratamento; Linha 4 e 5 - Tratamento com peçonha (25 µg); Linha 6 e 7 – Tratamento com Fração E5 (5 µg); Linha 8 e 9 - Tratamento com Anfotericina B (25 µg). O gel foi corado com Nitrato de Prata.



#### **7.4 Análise da produção de óxido nítrico por promastigotas de *Leishmania* após tratamento com peçonha de *Bothrops moojeni* e suas Frações protéicas**

Os níveis de NO foram determinados em sobrenadantes da cultura de formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) braziliensis* tratadas por 72 horas com as Frações protéicas e a peçonha bruta de *B. moojeni* e anfotericina B em diferentes concentrações. Na análise do sobrenadante da cultura de *L. (L.) amazonensis* (Fig. 9) foi observado que a Fração E5 (Fig. 9B) e a peçonha inibem fortemente a produção de NO pelos parasitos em diferentes concentrações (Fig. 9A) e apresentam significativas diferenças estatísticas com  $p < 0.001$  quando comparados com o tratamento com anfotericina B. Por outro lado, quando os sobrenadantes da cultura de *L. (V.) braziliensis* foram analisados (Fig. 9) foram observados aumento na produção de NO pelo parasito tratado com a Fração E5 (Fig. 9B), em qualquer concentração enquanto a peçonha mostra inibição irregular na síntese de NO, não apresentando característica dose dependente com a droga (Fig 9A). O tratamento dos parasitos *L. (V.) braziliensis* com anfotericina B leva ao aumento na produção de NO de acordo com a concentração do tratamento (Fig. 9C).

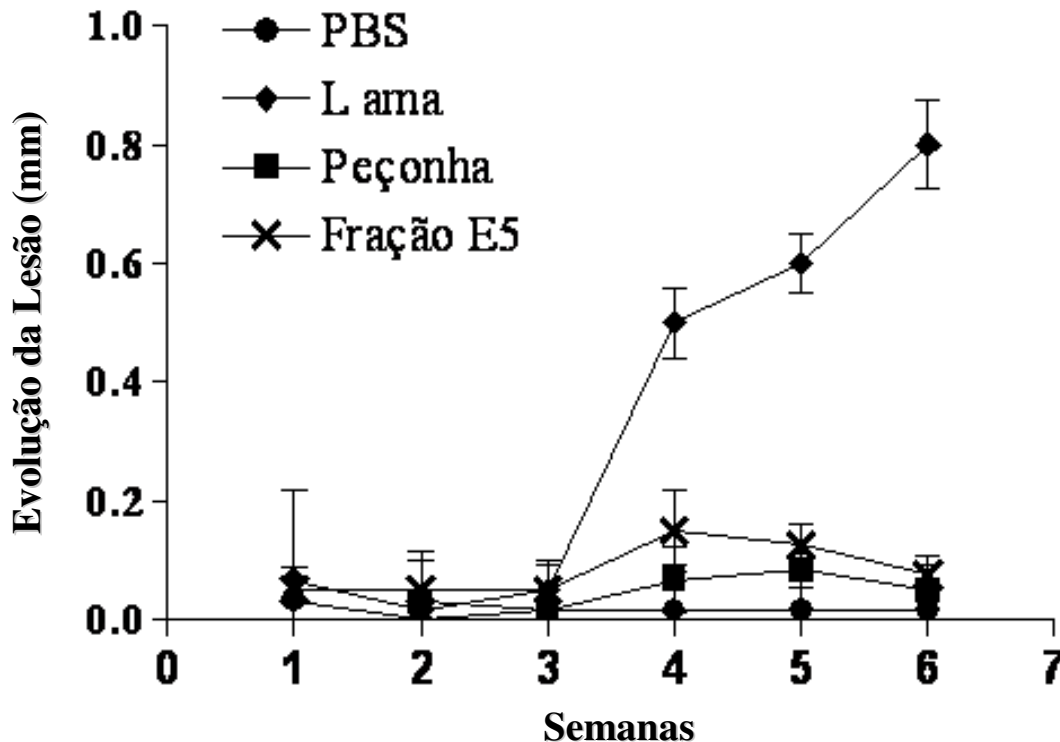


**Figura 9** – Efeito do tratamento na produção de Óxido Nítrico (NO) de *L. (L.) amazonensis* (PH8) e *L. (V.) brasiliensis* (M2903). Os níveis de NO foram determinados no sobrenadante da cultura dos parasitos tratados com peçonha (A), Fração E5 de *B. moojeni* (B) e Anfotericina B (C), em diferentes concentrações, ou sem tratamento (meio de cultura BHI). Fração E5 e a peçonha inibem fortemente a produção de NO em diferentes concentrações em *L. amazonensis*.

## 7.5 Avaliação do efeito do tratamento com peçonha e Fração E5 na evolução da lesão

Os resultados mostraram que parasitos *Leishmania (L.) amazonensis* provocam lesões em camundongos de linhagens susceptíveis (BALB/c). Durante o período de acompanhamento da evolução da lesão realizada até a 6ª semana, verificou-se que a espessura das patas dos animais infectados com parasitos não tratados até este período, aumentou em relação à pata contralateral não infectada (Fig. 10). As lesões produzidas nos animais devido à infecção foram de aspecto nodular, e não ulcerada. Assim os camundongos da linhagem BALB/c infectados com os parasitos não tratados desenvolveram aumento das patas com as mesmas apresentando-se também levemente edemaciadas e o desenvolvimento da lesão começou a surgir após a 4ª semana. Já os animais inoculados com os parasitos tratados com peçonha (25 µg) e com a Fração E5 (5 µg) não desenvolveram lesões, ou apresentaram lesões pouco significativas nas linhagens murinas do estudo (Fig. 10).

Pela a análise dos dados apresentados no presente trabalho, os parasitos tratados mostraram-se menos infectantes, devido ao pouco crescimento das lesões cutâneas aparentes. Além disso, camundongos BALB/c infectados com o parasito não tratado teve o desenvolvimento da lesão significativamente maior que os camundongos inoculados com *Leishmania amazonensis* tratadas (Fig. 10). Os dados mostram que os camundongos BALB/c infectados com os parasitos não tratados foram mais sensíveis que os camundongos com parasitos tratados.



**Figura 10** – Efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* e da Fração E5 na progressão da lesão de camundongos BALB/c infectados por *L. amazonensis*. Camundongos BALB/c foram infectados com  $10^6$  formas promastigotas de *L. (L.) amazonensis* não tratadas (*L. ama*), tratadas com peçonha (25  $\mu$ g) ou com Fração E5 (5  $\mu$ g) e foram monitorados durante 6 semanas após infecção e com a manutenção de animais controle (PBS). O tamanho da lesão foi obtido a partir da diferença entre a medida do coxim plantar infectado e o coxim plantar contralateral não infectado. As barras indicam o desvio padrão das diferenças entre a média das medidas dos coxins plantares (n=3). Observa-se que os animais inoculados com os parasitos tratados com peçonha e com a Fração E5 não desenvolveram lesões, ou apresentaram lesões pouco significativas nas linhagens murinas do estudo.

## 8 Discussão

Os estudos envolvendo *Leishmania* spp apresentam o foco na forma extracelular do parasito, conhecido como promastigota, ao invés da forma amastigota, devido à facilidade de manutenção de cultura *in vitro* e de não envolver outra cultura de células, como macrófagos. Em nosso estudo avaliamos o efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* em promastigotas de *Leishmania* spp no que se refere a viabilidade celular, a atividade proteolíticas de suas proteínas sobre o parasito e a produção de óxido nítrico *in vitro* além de estudarmos os efeitos na infectividade dos parasitos *in vivo*.

A peçonha de *Bothrops moojeni* foi eluída em cromatografia de coluna de DEAE (-) Sephacel. O fracionamento da peçonha em cromatografia de troca iônica resultou em cinco Frações. Uma forte banda protéica corada de aproximadamente 15 kDa foi observada na Fração E1, que poderia se uma miotoxina identificada por SOARES e cols.. (1998 e 2000). A Fração E2 apresentou uma banda correspondente a 24 kDa, que tem tamanho relacionado a metaloproteinase isolada por BERNARDES e cols.. (2008) e essa Fração protéica ainda apresenta forte atividade proteolítica sobre a azocaseína e o fibrinogênio sanguíneo identificados no nosso laboratório (dados não mostrados). Três principais proteínas foram observadas na Fração E3, e de acordo com OLIVEIRA (2001), a proteína de peso molecular de aproximadamente 36 kDa pertence a uma família de proteases com efeito antitrombótico, e com capacidade de uso medicinal. Quando analisamos as proteínas presentes na Fração E5, observamos a presença de proteínas pouco marcadas, mas com peso molecular de aproximadamente 15 e 35 kDa. Entretanto essa Fração também deve conter proteínas conhecidas com L-amino oxidase (LAO) com 70 kDa, que foram isoladas por TEMPONE e cols.. (2001) e

responsável pela coloração amarelada da peçonha da serpente. LAO também é conhecida por seu efeito antiparasitário (TEMPONE et al., 2001).

Em nosso estudo, o efeito da peçonha de *Bothrops moojeni* na viabilidade dos parasitos foi analisado utilizando o MTT como substrato depois do tratamento das *Leishmanias* por 72 horas com a peçonha bruta e as Frações protéicas obtidas da cromatografia de troca iônica (DEAE (-) Sephacel). Neste trabalho nos demonstramos que a peçonha é capaz de reduzir a viabilidade de ambas as espécies estudadas, embora *L. (L.) amazonensis* tenha se apresentado mais sensível ao tratamento ( $\geq 0.78 \mu\text{g}$ ) e *L. (V.) braziliensis* somente foi sensível a altas concentrações da peçonha (25 e 12.5  $\mu\text{g}$ ).

Em relação às Frações estudadas, somente a Fração E5 afetou efetivamente a viabilidade de *L.(L.) amazonensis* ( $\geq 0.156 \mu\text{g}$ ), enquanto as outras Frações (E1, E2, E3 e E4) tiveram resultados negativos na viabilidade, com algumas concentrações aumentando a viabilidade das células. Devido ao diferente resultado da peçonha e suas Frações obtidas após a cromatografia nas cepas dos parasitos, os mesmos indicam que o tratamento e a dose são diferentes para cada espécie, embora ambas as drogas tenham atuação eficiente na morte dos parasitos. Essa diferença é passível de explicação, pois existe todo o envolvimento do genótipo da espécie para a virulência, efetividade, capacidade de desenvolver patogenicidade e a resistência a drogas dos parasitos (SMITH et al., 2007).

A Fração E5 foi novamente cromatografada e resultou em seis novos picos que também foram testados na viabilidade celular dos parasitos. Entretanto somente as subfrações E5G1 e E5G5, que provavelmente apresentam as proteínas responsáveis pelos efeitos observados durante o tratamento com a Fração E5. De acordo com TEMPONE e col. (2001) a proteína LAO apresenta atividade antileishmania, e apresenta peso molecular de 70 kDa, que possivelmente

seria eluída por cromatografia de exclusão molecular na subFração E5G3, que não apresentou atividade no nosso trabalho. Acreditamos que isso pode ocorrer devido à liofilização realizada após cada cromatografia para concentração das Frações obtidas, e OLIVEIRA (2001) demonstra a perda de função de algumas proteínas após o processo de liofilização. E assim, nossos resultados mostram o efeito de novas proteínas na viabilidade de *Leishmania*.

A peçonha de *Bothrops moojeni* também foi capaz de alterar o perfil das proteínas padrões apresentadas por *Leishmania* spp. Através de análise por SDS-PAGE, um perfil eletroforético diferente foi observado nas proteínas de parasitos tratados ou não tratados com a peçonha de *Bothrops moojeni* e suas Frações protéicas. Proteínas de *Leishmania* spp já vem sendo descritas e isoladas por diferentes métodos e em diferentes espécies, com uma diferença de constituição protéica específica (KUBAR; FRAGAKI, 2006), embora ocorra manutenção dos genes de *Leishmania* por mais de 50 milhões de anos (LYNN; McMASTER, 2008). Uma banda protéica de 64 kDa apresentou um perfil eletroforético diferente após tratamento com a peçonha (Fig. 8). Esses resultados sugerem que a peçonha de *Bothrops moojeni* alterou as proteínas de *Leishmania* provavelmente pela degradação das proteínas comumente produzidas. Além disso, foi observado a ação da peçonha sobre o meio de cultura dos parasitos (BHI completo suplementado com 10% SFB), também com degradação das proteínas presentes no meio (dados não mostrados). Essa atividade da peçonha pode ser explicada pela sua característica proteolítica, já amplamente descrita (BERNARDES et al., 2008). Baseado nessas observações nos acreditamos que a peçonha provavelmente altera o meio de cultura dos parasitos e influencia o mesmo a crescer em ambiente alterado e leva a alterações fisiológicas do parasito para se adaptar ao novo meio (CLAYTON, 2002), além de também promover a atividade proteolítica sobre o próprio parasito.

A peçonha e as Frações também foram analisadas quanto à alteração na produção de NO basal de *Leishmania*. GENESTRA e cols. (2006) demonstraram que promastigotas de *L. (L.) amazonensis* produzem óxido nítrico, através da utilização de L-arginina presente no meio pela óxido nítrico sintase (NOS), sugerindo uma associação entre a infectividade do parasito com a capacidade de produzir NO no meio, o que facilitaria a fagocitose dos mesmos pelos macrófagos. Quando GENESTRA e cols. (2006) compararam a produção de NO pelos parasitos infectivos (promastigotas metacíclicos) e pelos parasitos não infectivos eles observaram significativo aumento de NO pelos parasitos infectivos. Nossos resultados indicam, através das análises do sobrenadante da cultura de *L. (L.) amazonensis*, que a Fração E5 e a peçonha inibem fortemente a síntese de NO pelos parasitos em diferentes concentrações. Por outro lado, quando os sobrenadantes da cultura de *L. (V.) braziliensis* foram analisados, observou-se uma aumento na produção de NO pelos parasitos tratados com a Fração E5, em todas as concentrações testadas, enquanto que a peçonha alterou de forma irregular a síntese de NO (Fig 9A). Assim, a infectividade de *Leishmania* pode ter sido alterada pelo tratamento com a peçonha.

Esse fato também pode ser observado pelo não crescimento de lesão na pata dos camundongos inoculados com os parasitos tratados durante seis semanas de estudos (Fig. 10). Através dos nossos resultados sugerimos que o tratamento com a peçonha ou com a Fração E5 afeta a estrutura celular dos parasitos (observado por eletroforese SDS-PAGE na fig. 8), dificultando que o mesmo se ligue adequadamente aos receptores das células fagocitárias, não permitindo a internalização dos parasitos ou fazendo com que os macrófagos desenvolvam uma resposta eficiente contra *Leishmania*. Em trabalho de AFONSO-CARDOSO e cols. (2007), foi analisado o efeito da lectina de *Synadenium carinatum* na resposta imune de camundongos BALB/c infectados com *L. amazonensis* demonstrando que a resposta efetiva a produção de



anticorpos está diminuída e há aumento de citocinas responsáveis pelo perfil TH1 característico do controle da infecção por *Leishmania* e conseqüente não aparecimento da lesão nas patas dos camundongos tratados com a lectina, corroborando com os nossos resultados.

O uso da Anfotericina B não modificou as proteínas e a produção de NO por *Leishmania* spp. O modo de ação da anfotericina B consiste na alteração da molécula de ergosterol da célula, que é um esteróide presente na membrana de *Leishmania*, aumentando a permeabilidade da membrana celular e isso permite a formação de um fluxo de íons para o interior do parasito e assim provocando a morte da célula (ELLIS, 2002).

A peçonha de *Bothrops moojeni* parece atuar de modo diferente. GONÇALVES e cols. (2002) demonstraram, por microscopia eletrônica, que ocorrem modificações na molécula de mitocôndria da célula após tratamento com peçonha de *Bothrops jararaca*. Essa alteração mitocondrial indica que a peçonha pode alterar a cadeia respiratória do parasito, e conseqüentemente diminuindo os níveis de moléculas de ATP levando a falta de energia para a célula e finalmente a morte do parasito.

O presente trabalho demonstra os efeitos da peçonha de *Bothrops moojeni* e suas Frações protéicas (Fração E5) em parasitos *L. (L.) amazonensis* e *L. (V.) brasiliensis in vitro*. Nossos dados estão de acordo com os resultados obtidos por TEMPONE e cols. (2001) que observaram a atividade da proteína L-amino oxidase presente na peçonha de *Bothrops moojeni* na morte de parasitos da espécie *Leishmania* spp. Nossos resultados mostram que a peçonha de *Bothrops moojeni* apresentam proteínas que inibem a produção de NO pelos parasitos, alteram as proteínas comumente produzidas e reduzem a viabilidade de promastigotas de *Leishmania* spp 'in vitro'. Além disso, observamos que a infectividade dos parasitos tratados com a peçonha bruta e com a

Fração E5 esta diminuída, com ausência de lesão nas patas dos camundongos inoculados com parasitos tratados com as respectivas drogas.

## 9 Conclusão

Diante dos resultados do presente estudo concluímos que:

A peçonha de *Bothrops moojeni* apresenta efeito sobre as formas promastigotas de *Leishmania* spp, sendo capaz de modificar as proteínas comumente produzidas pelo parasito.

A peçonha e suas Frações protéicas obtidas após diferentes cromatografias reduzem a viabilidade celular e a produção de NO de *Leishmania*, levando a diminuição da infectividade dos parasitos tratados, observada pela ausência de lesão nas patas dos camundongos inoculados com parasitos tratados com as respectivas drogas.

## 10 Referencias Bibliograficas

AFONSO-CARDOSO, S. R.; RODRIGUES, F. H.; GOMES, M. A. B.; SILVA, A. G.; ROCHA, A.; GUIMARAES, A. H. B.; CANDELORO, I.; FAVORETO Jr, S.; FERREIRA, M. S.; SOUZA, M. A. Protective effect of lectin from *Synadenium carinatum* on *Leishmania amazonensis* infection in BALB/c mice. **Korean Journal of Parasitology**, vol. 45, p. 255-266, 2007.

AIRES, J.; CHOCIAY, M. F.; NASCIMENTO, M. M. P.; FIGUEIREDO, J. F. C.; ROSELINO, A. M. F. PP013-Maxadilan (MAX)- Proteína salivar de *Lutzomia longipalpis*: detecção de anticorpos antiMAX em leishmaniose tegumentar americana (LTA) e expressão gênica e protéica de MAX em *Lutzomia nevai*. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, 80 (supl 3), S333-338, 2005.

ALVAR, J.; YACTAYO, S.; BERN, C. *Leishmaniasis* and poverty. **Trends in Parasitology**, vol 22 (12), p. 552-557, 2006.

AMATO, V. S.; TUON, F. F.; BACHA, H. A.; AMATO-NETO, V.; NICODEMO, A. C. Mucosal *Leishmaniasis* Current scenario and prospects for treatment. **Acta Tropica**, vol 105, p. 1-9, 2008.

AYRES, D. C.; MARCUCCI, M. C.; GIORGIO, S. Effects of Brazilian propolis on *Leishmania amazonensis*. **Memória Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 102 (2), p 215-220, 2007.

BAILEY, M. S.; LOCKWOOD, D. N. Cutaneous *Leishmaniasis*. **Clinica Dermatológica**, vol 25 (2), p. 203-211, 2007.

BALESTIERI, F. M. P.; QUEIROZ, A. R. P.; SCAVONE, C.; ASSIS COSTA, V. M.; BARRAL-NETO, M.; ABRAHAMSONH, I. A. *Leishmania (Leishmania) amazonensis* – induced inhibition of nitric oxide synthesis in hos macrophages. **Microbes and Infection**, vol. 4 (1), p. 23-29, 2002.

BARRAVIERA, B. **Venenos**: aspectos clínicos e terapêuticos dos acidentes por animais peçonhentos. Rio de janeiro: EPUB, 411p. 1999.

BERMAN, J. D. Human *Leishmaniasis*: clinical, diagnostic, and chemotherapeutic developments in the last 10 years. **Clinical Infectious Diseases**, vol. 24(4), p. 684-703, 1997.

BERNARDES, C. P.; SANTOS-FILHO, N. A.; COSTA, T. R.; GOMES, M. S. R.; TORRES, F. S.; COSTA, J.; BORGES, M. H.; RICHARDSON, M.; SANTOS, D. M.; PIMENTA, A. M. C.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; SOARES, A. M.; OLIVEIRA, F. Isolation and structural characterization of a new fibrin(ogen)olytic metalloproteinase from *Bothrops moojeni* snake venom. **Toxicon**, vol. 51, p. 574-584, 2008.

BJARNASON, J. B.; FOX, J. W. Hemorrhagic toxins from snake venoms. **Journal of Toxicology: Toxinology review**, vol. 7 (2), p. 121-209, 1988/89.

BORGES, R. C.; ARAUJO, A. F. B. Seleção de habitat entre duas espécies de jararaca (*Bothrops moojeni* Hoge and *Bothrops neuwiedi* Wagler) (Serpentes: Viperidae). **Revista Brasileira de Biologia**, vol. 58, p. 591-601, 1998.

BRAGA, F. G.; BOUZADA, M. L.; FABRI, R. L.; DE O MATOS, M.; MOREIRA, F. O.; SCIO, E.; COIMBRA, E. S. Anti*Leishmanial* and antifungal activity of plants used in traditional medicine in Brazil. **Journal of Ethnopharmacology**, vol. 111 (2), p. 396-402, 2007.

BRASIL. **Manual de controle da Leishmaniose Tegumentar Americana**: Organização: Gerência Técnica de Doenças Transmitidas por Vetores e Antropozoonoses. - Coordenação de Vigilância Epidemiológica - Centro Nacional de Epidemiologia – Fundação Nacional de Saúde - Ministério da Saúde Brasília, 62 p., 2000

BRITES, V. L. C.; BAUAB, F. A. Fauna ofidiana do município de Uberlândia - Minas Gerais - Brasil. I - Ocorrência na área urbana. **Revista Ciências Biomédicas**, vol. 3 (1), p. 3-8, 1988.

CARDOSO, J. L.; FAN, H. W.; FRANÇA, F. O.; JORGE, M. T.; LEITE, P. P.; NISHIOKA, S. A.; ÁVILA, A.; SANO-MARTINS, I. S.; TOMY, S. C.; SANTORO, M. L. Randomized comparative trial of three antivenoms in the treatment of envenoming by lance-headed vipers

(*Bothrops jararaca*) in São Paulo, Brasil. **QJM: an international journal of medicine**, vol. 86 (5), p. 315-325, 1993.

CLAYTON, C. E. Life without transcriptional control? From fly to man and back again. **The EMBO Journal**, vol. 21, p. 1881-1898, 2002.

COSTA, L. A.; FORNARI, M. C.; BERARDI, V. E.; MILES, H. A.; DIEZ, R.A. 'in vivo' effect of snake phospholipase A<sub>2</sub> (crotoxin + cardiotoxin) on serum IL-1 $\alpha$ , TNF- $\alpha$  and IL-1ra level in humans. **Immunology letters**, vol. 75 (2), p. 137-141, 2001.

COSTA, S. M.; CECHINEL, M.; BANDEIRA, V.; ZANNUNCIO, J. C.; LAINSON, R.; RANGE, E. F. *Lutzomyia* (*Nyssomyia*) *whitmani* s.l. (Antunes & Coutinho, 1939) (Diptera: Psychodidae: Phlebotominae): geographical distribution and the epidemiology of American cutaneous *Leishmaniasis* in Brazil – Mini-review. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 102 (2), p. 149-153, 2007.

DAVIES, C. R., KAYE, P., CROFT, S. L., SUNDAR, S. *Leishmaniasis*: new approaches to disease control. **British Medical Association**. 326, 377-382, 2003.

DEOLINDO, P.; TEIXEIRA-FERREIRA, A. S.; MELO, E. J. T.; ARNHOLDT, A. C. V.; SOUZA, W.; ALVES, E. W.; DA MATTA, R. A. Programmed cell death in *Tripanosoma cruzi* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Memórias do Instituto Oswaldo Cruz**, vol. 100 (1), p. 33-38, 2005.

ELLIS, D. Amphotericin B: spectrum and resistance. **Journal Antimicrobials Chemotherapy**, vol. 49 (supl. 1), p. 7-10, 2002.

ESTÊVÃO-COSTA, M. I.; DINIZ, C. R.; MAGALHÃES, A.; MARKLAND, F. S.; SANCHEZ, E.: Action of Metalloproteinases Mutalysin I and II on Several Components of the Hemostatic and Fibrinolytic Systems. **Thrombosis Research**, vol. 99 (4), p. 363-373, 2000.

FERREIRA, A. S.; SOUZA, M. A.; BARBOSA, N. R.; SILVA, S. S. *Leishmania amazonensis*: Xylitol as inhibitor of macrophage infection and stimulator of macrophage nitric oxide production. **Experimental Parasitology**, vol. 119 (1), p. 74-79, 2008.

FREILE-PELEGRIN, Y.; ROBLEDO, D.; CHAN-BACAB, M. J.; ORTEGA-MORALES, B. O. Anti*Leishmanial* properties of tropical marine algae extracts. **Fitoterapia**, 2008, doi: 10.1016/j.fitote.2008.02.006

FRY, B. G. Structure-function properties of venom components from Australian elapids. **Toxicon**, vol. 37 (1), p. 11-32, 1999.

GAO, R.; ZHANG, Y.; MENG, Q. X.; LEE, W. H.; LI, D. S.; XIANG, Y. L.; WANG, W. Y. Characterization of three fibrinogenolytic enzymes from Chinese green tree viper (*Trimeresurus stejnegeri*) venom. **Toxicon**, vol. 36 (3), p. 457-467, 1998.



GENESTRA, M., GUEDES-SILVA, D., SOUZA, W.S., CYSNE-FINKELTEIN, L., SOARES-BEZERRA, R.J., MONTEIRO, F.P., LEON, L.L. Nitrite oxide synthase (NOS) characterization in *Leishmania amazonensis* axenic amastigotes. **Archives Medical Research**, Vol. 37, p. 328–333, 2006.

GONCALVES, A. R.; SOARES, M.J.; SOUZA, W.; DAMATTA, R. A.; ALVES, E. W. Ultrastructural alterations and growth inhibition of *Trypanosoma cruzi* and *Leishmania major* induced by *Bothrops jararaca* venom. **Parasitology Research**, vol. 88, p. 598–602, 2002.

GRADONI, L. An update on anti*Leishmanial* vaccine candidates and prospects for a canine *Leishmania* vaccine. **Veterinary Parasitology**, vol. 100, n. 1-2, p. 87-103, 2001.

GREEN, L.C.; WAGNER, D.A.; GLOGOWKI, J.; SKIPPER, P.L.; WISHNOR, J.S.; TANNENBAUM, S.R. Analysis of nitrate, nitrite, and [15N] nitrate in biological fluids. **Analysis Biochemical**, vol. 126, p. 131-138, 1982.

HANDMAM, E. Cell Biology of *Leishmania*. **Advances in Parasitology**, vol. 44 (1), p. 1-39, 2000.

ITZHAKI, R. F.; GILL, D. M. A micro-biuret method for estimating proteins. **Analisis Biochemical**, vol. 9, p. 401-410, 1964.

JARDIM, I. S. Papel dos proteassomas na interação e desenvolvimento de *Leishmania chagasi* em macrófagos murinos. **Tese de Doutorado**, Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto. 2001.

KAMIGUTI, A. S.; SANO-MARTINS, I. S. South American snake venoms affecting homostasis. **Journal of Toxicology: Toxinology Review.**, vol. 14, p. 359-374, 1995.

KIMA, P. E.; CONSTANT, S. L.; HANNUN, L.; COLMENARES, M.; LEE, K. S.; HABERMAN, A. M.; SHLOMCHICK, M. J.; McMAHON-PRATT, D. Internalization of *Leishmania mexicana* Complex Amastigotes via the Fc Receptor Is Required to Sustain Infection in Murine Cutaneous *Leishmaniasis*. **The Journal of Experimental Medicine**, vol. 191 (6), p. 1063-1067, 2000

KINI, R. M.; EVANS, H. J. Structural domains in venom proteins: evidence that metalloproteinases and nonenzymatic platelet aggregation inhibitors (desintegrins) from snake venoms are derived by proteolysis from a common precursor. **Toxicon**, vol. 30, p. 265-293, 1992.

KUBAR, J.; FRAGAKI, K. *Leishmania* proteins derived from recombinant DNA: current status and next steps. **Trends in Parasitology**, vol. 22, p. 111-116, 2006.

LAEMMLI, U. K. Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. **Nature**, vol. 227 (5259), p. 680-685, 1970.

LAISON, R.; SHAW, J. J. Evolution, classification and geographical distribution. In: PETERS, W.; KILLICK-KENDRICK, R. **The *Leishmaniases* in Biology and Medicine**. Biology and Epidemiology. London: Academic Press, vol 1 (cap. 7), p. 1-120, 1987.

LOCKSLEY, R. M.; REINER, S. L.; HATAM, F.; LITTMAN, D. R.; KILLEN, N.; Helper T cells without CD4: Control of *Leishmaniasis* in CD4-deficient mice. **Science**, v. 261, p. 1448-1451, 1993.

LOCKSLEY, R. M.; REINER, S. L.; Murine *Leishmaniasis* and the regulation of CD4+ Cell Development. In: BOOTHROYD, J.C., KOMUNIECKI, R., **Molecular approaches to Parasitology**. New York: Wiley-Liss, p. 455-466, 1995.

LODGE, R.; DESCOTEAUX, A. Modulation of phagolysosome biogenesis by the lipophosphoglycan of *Leishmania*. **Clinical Immunology**, v.114, n.3, p.256-265, 2005.

LYNN, M., A.; McMASTER, R. *Leishmania*: conserved evolution - diverse diseases. **Trends in Parasitology**, vol. 24, n. 3, p. 103-105, 2008.

MARKLAND, F. S. Snake venoms and the hemostatic system. **Toxicon**, vol. 36 (12), p.1749-1800, 1998.

MATRISIAN, L. M. Metalloproteinases and the inhibitors in matrix remodeling. **Trends in Genetics**, vol. 6, p. 121-125, 1990.

MAUEL, J. Macrophages-parasite interactions in *Leishmania* infections. **Journal of Leukocyte Biology**, vol. 47, p. 187-193, 1990.

MICHALICK, M. S. M. Gênero *Leishmania*. In: NEVES, D. P. **Parasitologia Humana**. 11 ed. São Paulo: Editora Atheneu, 2005.

MOSMANN, T. Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays. **Journal of Immunology**, vol. 65, p. 55-63, 1983.

MOSSER, D.M.; BRITTINGHAM, A. *Leishmania*, macrophages and complement: a tale of subversion and exploitation. **Parasitology**, vol. 115 (supl. 5), S9-S23. 1997.

NAULA, C.; PARSONS, M.; MOTTRAM, J. C. Protein kinases as drug targets in trypanosomes and *Leishmania*. **Biochimica et Biophysica Acta**, vol. 1754 (1-2), p. 151 – 159, 2005

NEVALAINEN, T. J.; QUINN, R. J.; HOOPER, J. N. Phospholipase A2 in Porifera. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part B**, vol. 137 (3), p. 413-420, 2004

OLIVEIRA, F. Novas proteases da peçonha de *Bothrops moojeni* (Caiçaca): Purificação de quatro isoformas de fibrinogenases (Bth $\alpha$ s) e caracterização bioquímica da BthTl. **Tese de Doutorado**, Universidade de Brasília. 2001.

PALATNIK-DE-SOUSA, C. B. Vaccines for *Leishmaniasis* in the fore coming 25 years. **Vaccine**, vol. 26, p. 1709-1724, 2008.

PIACENZA, L.; PELUFFO, G.; RADI, R. L-Arginine-dependent suppression of apoptosis in *Trypanosoma cruzi*: contribution of the nitric oxide and polyamine pathways. **Proceeding of the National Academy of Sciences of the United States of America**, vol. 13, p. 7301-7306, 2001.

PINHO, F. M. O.; OLIVEIRA, E. S.; FALEIROS, F.. Acidente ofídico no estado de Goiás. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 50 (1), p. 93-96, 2004.

PINHO, F. M. O.; PEREIRA, I.D. Ofidismo. **Revista da Associação Médica Brasileira**, vol. 47 (1), p. 24-29, 2001.

ROCHA, M. M. T. da; FURTADO, M. de F. D. Caracterização individual do veneno de *Bothrops alternatus*, Duméril, Bibron & Duméril em função da distribuição geográfica no Brasil (Serpentes, Viperidae). **Revista Brasileira de Zoologia**, vol. 22 (2), p. 383-393, 2005

RODRIGUES, F. H.; AFONSO-CARDOSO, S. R.; GOMES, M. A. B.; BELLETI, M. E.; ROCHA, A.; GUIMARAES, A. H. B.; CANDELORO, I.; SOUZA, M. A. Effects of imidocarb

and levamisole on the experimental infection of BALB/c mice by *Leishmania (Leishmania) amazonensis*. **Veterinary Parasitology**, vol. 139 (1-3), p. 37-46, 2006.

RODRIGUES, V. M.; SOARES, A. M.; MANCIN, A. C.; FONTES, M. R. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I. GIGLIO, J. R. Geografic variations in the composition of myotoxins from *Bothrops neuwiedi* snake venons: bioquimical chacarcterization and biological activity. **Comparative Biochemistry and Physiology – Part A: Molecular & Integrative Physiology**, vol. 121 (3), p. 215-222, 1998.

SMITH, D. F.; PEACOCK, C.; CRUZ, A. K. Comparative genomics from genotype to disease phenotype in the *Leishmaniasis*. **International Journal of Parasitology**, vol. 37, p. 1173-1186, 2007.

SOARES, A.M. Caracterização bioquímica parcial das miotoxinas básicas do veneno de *Bothrops moojeni*: seqüência aminoterminal, cristalografia e estudo da transição dos estados nativo e desenovelado. **Dissertação de Mestrado**, Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto, 1997.

SOARES, A. M.; RODRIGUES, V. M.; HOMSI-BRANDEBURGO, M. I.; TOYAMA, M. H.; LOMBARDI, F. R.; ARNI, R. K.; GIGLIO, J. R. A rapid procedure for the isolation of the Lys-49 myotoxin II from *Bothrops moojeni* (caissaca) venom: biochemical characterization, crystallization, myotoxic and edematogenic activity. **Toxicon**, vol. 36, p. 503–514, 1998.

SOARES, A.M.; ANDRIÃO-ESCARSO, S.H.; ANGULO, Y.; LOMONTE, B.; GUTIÉRREZ, J.M.; MARANGONI, S.; TOYAMA, M.H.; ARNI, R.K.; GIGLIO, J.R. Structural and functional characterization of a myotoxin I from *Bothrops moojeni* (caissaca) snake venom. **Archives of Biochemistry and Biophysics**, vol. 373, p. 7–15, 2000.

STÁBELI, R. G.; F. AMUI, S. F.; SANT'ANA, C. D.; PIRES, M. G.; NOMIZO, A.; MONTEIRO, M. C.; ROMÃO, P. R. T.; GUERRA-SÁ, R.; VIEIRA, C. A.; GIGLIO, J. R. *Bothrops moojeni* myotoxin-II, a Lys49-phospholipase A<sub>2</sub> homologue: An example of function versatility of snake venom proteins. **Comparative Biochemistry and Physiology, Part C: Toxicology & Pharmacology**, vol. 142 (3-4), p. 371-381, 2006.

STUHER, D. J. Mammalian nitric oxide synthases. **Biochemistry and Biophysics Acta**, vol. 1411, p. 217–230, 1999.

SWANSON, M.S.; FERNANDEZ-MOREIA, E. A microbial strategy to multiply in macrophage: the pregnant pause. **Traffic**, vol. 3 (3), p. 170-177, 2002.

TAVARES, J.; OUAISSI, M.; OUAISSI, A.; CORDEIRO-DA-SILVA, A. Characterization of the anti-*Leishmania* effect induced by cisplatin, na anticancer drug. **Acta Tropica**, vol. 103, p. 133-141, 2007.

TEMPONE, A. G.; ANDRADE Jr, H. F.; SPENCER, P. J.; LOURENÇO, C. O.; ROGERO, J. R.; NASCIMENTO, N. *Bothrops moojeni* venom kill *Leishmania* spp with Hydrogen Peroxide

generated by its L-amino acid oxidase. **Biochemical and Biophysical Research Communicatios**, vol. 280 (3), p. 620-624, 2001.

TEMPORAL, R. M.; CYSNE-FINKELSTEIN, L.; ECHEVARRIA, A.; LEON, L. L.; GENESTRA, M. Amidine derivatives and *Leishmania amazonensis*: evaluation of the effect in the nitric oxide (NO) production on the parasite-macrophage interaction. **Journal of Enzyme Inhibition Medical Chemistry**, vol. 20, p. 13–18, 2005.

WANG, Z.E.; REINER, S.L., HATAM, F., HEINZEL, F.P.; BOUVIER, J.; TURK, C.W.; LOCKSLEY, R.M.; Targeted activation of CD8 cells and infection of beta 2-microglobulin-deficient mice fail to confirm a primary protective role for CD8 cells in experimental *Leishmaniasis*. **Journal of Immunology**, v. 151, n. 4, p. 2077-2086, 1993.